

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Struktur-Funktions-Beziehung der ADAM17 Prodomäne

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Theis Luca Hülsebus
aus Leer

Kiel, 2020

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Struktur-Funktions-Beziehung der ADAM17 Prodomäne

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Theis Luca Hülsebus
aus Leer

Kiel, 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grötzinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Tholey

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 02.02.2021

gez.:

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 ADAMs	1
1.2 ADAM17	4
1.2.1 Klinische Relevanz	5
1.2.2 Regulation	7
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Chemikalien	14
3.1.2. Medien	14
3.1.3 Puffer.....	15
3.1.4 Enzyme	18
3.1.5 Plasmide.....	18
3.1.6 Primer.....	19
3.1.7 Kommerzielle Marker	19
3.1.8 ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 Transformation.....	20
3.2.2 Mini-Plasmidpräparation	20
3.2.3 Restriktionsverdau	20
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.2.5 Gelextraktion.....	23
3.2.6 Ligation	23
3.2.7 Transformation in <i>E. coli</i> Rosetta 2 und <i>E. coli</i> BL21 pLysS	24
3.2.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger	25
3.2.9 Expression in LB-Medium.....	25

3.2.10 Expressionstest.....	26
3.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.2.12 Proteinreinigung.....	28
3.2.13 UV-Spektrum.....	29
3.2.14 Massenspektrometrische Analyse	29
3.2.15 Zirkulardichroismus.....	29
3.2.16 Thermostabilität	30
3.2.17 Dialyse	30
3.2.18 Pufferaustausch	30
3.2.19 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	31
3.2.20 Enzym-Aktivitäts-Assay	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Konstrukt der ADAM17 Prodomäne (Mutante).....	33
4.1.1 Plasmid.....	33
4.1.2 Aminosäuresequenz	35
4.2 Klonierung	36
4.2.1 Restriktionsverdau	36
4.2.2 Agarose – Gelelektrophorese	37
4.2.3 DNA-Isolation aus Agarosegelen	38
4.2.4 Ligation	38
4.2.5 Weiterer Restriktionsverdau als Kontrolle (Verhinderung Re-Ligation)	39
4.3 Vervielfältigung und Expression des Expressionsvektors.....	39
4.3.1 Transformation in <i>E. coli DH5α</i>	39
4.3.2 Plasmidpräparation	40
4.3.3 Transformation in Expressionsstämme <i>E. coli Rosetta 2</i> und <i>E. coli BL21 pLysS</i> ..	40
4.4 Expression	41
4.4.1 Expressionstest.....	41

4.4.2 Löslichkeit.....	42
4.5 Proteinreinigung	43
4.5.1 Affinitätschromatographie	43
4.5.2 Größenausschlusschromatographie.....	44
4.5.3 Reduktion der Disulfidbrücken.....	46
4.5.4 Konzentrierung der Proteinlösung	48
4.6 Strukturelle Untersuchungen	49
4.6.1 UV-Spektrum.....	49
4.6.2 Massenspektrometrische Analyse	50
4.6.3 Zirkulardichroismus-Spektrum	51
4.6.4 Thermostabilität	52
4.7 Weitere Untersuchungen	53
4.7.1 Grundprinzip und Voraussetzungen zur NMR-Spektroskopie	53
4.7.2 Stabilität der Mutante ADAM17 Prodomäne	53
4.7.3 Lösungsansätze	54
4.7.3.1 Dialyse.....	54
4.7.3.2 Pufferaustausch der Proteinlösungen	54
4.7.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	55
4.8 Enzym-Aktivitäts-Assay.....	56
5 Diskussion	57
6 Anhang	61
6.1 Literaturverzeichnis	61
6.2 Abkürzungsverzeichnis	72
6.3 Abbildungsverzeichnis	75
6.4 Formelverzeichnis	76
6.5 Tabellenverzeichnis	77
6.6 Eigenschaften der Mutante ADAM17 Prodomäne.....	78

6.7 Vektorkarte	78
6.8 DNA-Sequenzierungsergebnisse	79
6.9 Bericht Massenspektrometrische Analyse	80
Danksagung	84
Eidesstattliche Erklärung	85
Publikation	86

1 Einleitung

1.1 ADAMs

Proteasen sind Enzyme, die durch Hydrolyse von Peptidbindungen Proteine spalten können. Diesen Vorgang bezeichnet man als Proteolyse. Das besondere an ihm ist, dass er, im Gegensatz zu vielen anderen von Enzymen katalysierten Vorgängen, irreversibel ist. Proteasen lassen sich anhand ihrer funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum unterteilen in Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen.

Zu den Metalloproteasen gehört unter anderem die Gruppe der Metzinkine. Metzinkine besitzen ein Zink-Ion als Ko-Faktor im katalytischen Zentrum, einen konservierten Methionin-Rest und ein HEXXHXXGXXH-Zinkbindungsmotiv^{1,2}. ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinases*) wiederum sind membranverankerte Metzinkine der Adamalysin-Unterfamilie³. Sie besitzen eine dynamische, modular angeordnete Multidomänen-Struktur⁴⁻⁶ ähnlich den MMPs (Matrix-Metalloproteasen)³, durch welche sie eine für ihre komplexe Funktionalität grundlegende intrinsische Flexibilität erlangen⁴. Von den 40 bisher teilweise mehrfach beschriebenen Mitgliedern der ADAM-Familie wurden 37 bei Mäusen und 21 beim Menschen gefunden⁷. Beim Menschen werden sie auf verschiedenen Zellen und in verschiedenen Geweben sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr heterogen exprimiert⁸. Für neun der humanen ADAMs konnte bisher keine proteolytische Aktivität⁷ und auch keine anderweitige physiologische Funktion beschrieben werden⁹.

Die Multidomänenstruktur der ADAMs setzt sich aus einem N-terminalen Signalpeptid gefolgt von einer Prodomäne, der katalytischen Proteasedomäne, einer Disintegrindomäne, einer cysteinreichen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einer *Stalk*-Region, einer Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Region zusammen¹. Dieser Aufbau ist schematisch in **Abbildung 1.1** dargestellt.

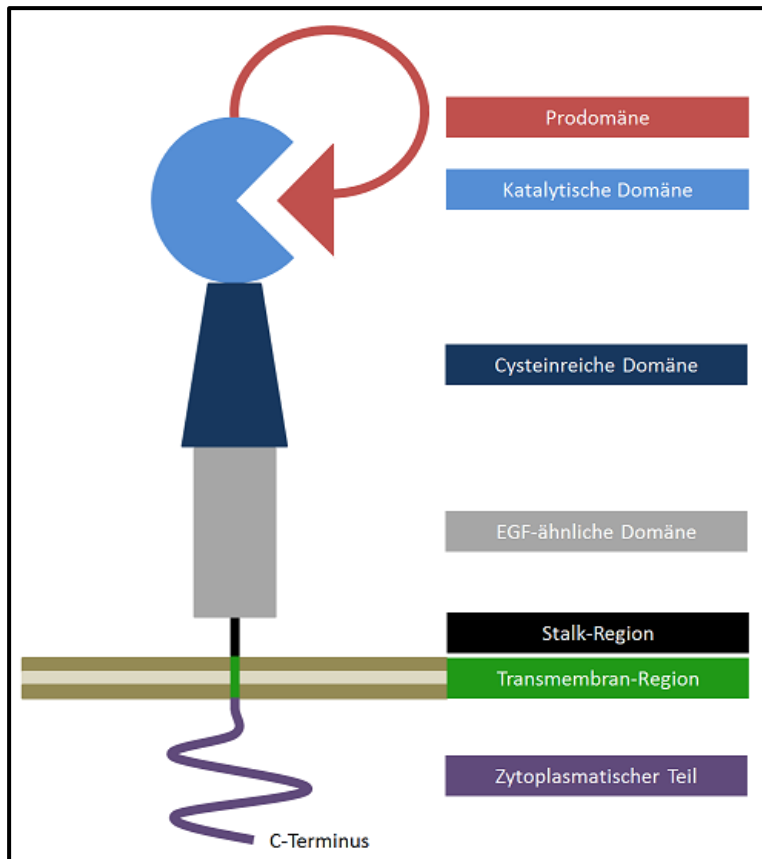


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau von ADAMs: ADAMs bestehen aus Prodomäne, katalytischer Domäne, cysteinreicher Domäne, EGF-ähnlicher Domäne, Stalk-Region, Transmembran-Region und zytoplasmatischem Teil.

Einige ADAMs sind in der Lage, die Ektodomänen von Typ-1- und Typ-2-Transmembranproteinen¹ proteolytisch zu spalten¹⁰. Diese posttranslationale Modifikation wird auch als Ektodomänen-*Shedding* oder *Shedding* bezeichnet¹¹. Die freigesetzten Ektodomänen können eine eigene biologische Aktivität besitzen, die sich von der ihres membranständigen Pendants unterscheidet, und eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beeinflussen¹². *Shedding* ist außerdem die Voraussetzung für das sogenannte *RIPing* (*Regulated Intramembrane Proteolysis*), bei dem nach erfolgtem Ektodomänen-*Shedding* das membranständige Fragment weiter proteolytisch prozessiert und somit ein intrazelluläres, ebenfalls biologisch aktives Signalfragment freigesetzt werden kann¹³. Schätzungsweise bis zu vier Prozent aller Zelloberflächenproteine können durch Ektodomänen-*Shedding* prozessiert werden¹⁴. Unter anderem gehören Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Zell-Zell-Interaktionsmoleküle und andere Transmembranproteine zu diesem Substratspektrum^{3,14–18}. Auf der einen Seite spielen ADAMs daher in physiologischen Abläufen wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Zell-Migration, Zell-Wachstum und Zell-Differenzierung,

Immunantwort und weiteren verschiedensten Signalwegen eine wichtige Rolle^{1,7,13}. Folgerichtig sind sie auf der anderen Seite bei Fehlregulation in eine Reihe von pathophysiologischen Vorgängen wie beispielsweise chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen, Karzinogenese und Metastasierung verschiedener Tumoren, und kardiovaskuläre, neurodegenerative, metabolische und epitheliale Erkrankungen involviert^{1,3,5,7,13,14,16,19–21}.

Die Aktivität der ADAMs und ihre Regulation ist Gegenstand zahlreicher aktueller Untersuchungen und erweist sich bisher als überaus komplex^{1,3,7,9}. Erwähnenswert diesbezüglich ist, dass ADAMs in ihrer Aktivität und Funktionalität teilweise deutliche Unterschiede *in vivo* und *in vitro* zeigen³. Ein Erklärungsversuch besteht in der Annahme, dass bei ADAMs weniger die Substratspezifität als vielmehr das biochemische Milieu einen übergeordneten Einfluss haben könnte³.

Aufgrund ihrer umfassenden Rolle bei vielen pathophysiologischen Vorgängen erscheinen ADAMs als attraktive mögliche therapeutische Ziele. Die Herstellung von therapeutisch einsetzbaren Inhibitoren hat sich bisher als erfolglos erwiesen, da wahrscheinlich die Involvierung der ADAMs in verschiedenste physiologische Prozesse zahlreiche, teilweise unvorhersehbare und schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich bringt^{7,17}.

1.2 ADAM17

ADAM17 ist mit bisher über 70 beschriebenen Substraten²², neben ADAM10²³, eines der meist erforschten und physiologisch und pathophysiologisch bedeutsamsten²³ Mitglieder der Familie der ADAMs²⁴.

ADAM 17 und dessen am engsten verwandte Metalloprotease ADAM10²³ besitzen jeweils ein großes Substratspektrum²⁵, welches sich partiell überschneidet. Bei chronischer Inhibition von ADAM17 vermag ADAM10 sogar, bei einigen Substraten die *Shedding*-Funktion zumindest partiell zu kompensieren¹⁵. Dies führt zu der Annahme, dass zusätzlich zur Funktion des katalytischen Zentrums weitere Mechanismen zur Substratspezifität beitragen²⁵. Es wurde überdies gezeigt, dass einige der Aufgaben von ADAM10 und ADAM17 bei artifiziell herbeigeführtem Verlust der einen Metalloprotease zumindest bis zu einem gewissen Grad durch die jeweils andere übernommen werden können³. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass gewisse Substrate nicht nur von den membranständigen Metalloproteasen, sondern auch von ihren durch *Shedding* entstandenen löslichen Ektodomänen prozessiert werden können²⁶.

Zu den Substraten von ADAM17 gehören unter anderem die EGFR-Liganden Amphiregulin, HB-EGF, Neuregulin und TGF- α ^{15,17,23,27,28}, die Zelladhäsionsmoleküle CD44 und L-Selektin^{15,23,29}, Zytokine wie TNF- α ^{1,15,17,30–33}, die Rezeptoren IL-6R, TNFR1, TNFR2 und VEGFR2^{22,23,32} und andere Membranproteine wie APP¹⁷. Erwähnenswert an dieser Stelle ist, dass ADAM17 *in vitro* und *in vivo* ein abweichendes enzymatisches Verhalten zeigen kann³⁴. So werden manche Substrate von ADAM17 zwar *in vitro* prozessiert, *in vivo* lässt sich jedoch kein *Shedding* beobachten. Mehrere Faktoren wie zelluläre Lokalisation, biochemisches Milieu und Mechanismen in der Substraterkennung und -bindung können hier möglicherweise von Bedeutung sein.

ADAM17 spielt entsprechend des Substratspektrums eine wichtige Rolle in vielfältigen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Immunantwort³⁵, unterschiedlichen Gewebewachstums- und -homöostaseprozessen oder Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen^{14,22,34,36,37}. Auf der anderen Seite kann eine gestörte Regulation von ADAM17 gleichermaßen zu einer kritischen Funktion bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen wie zum Beispiel Karzinogenese oder chronischer Inflammation führen^{30,36–38}.

1.2.1 Klinische Relevanz

Eine gestörte Aktivität von ADAM17 wurde sowohl bei Mäusen als auch Menschen bereits mit einer Vielzahl von klinischen Auffälligkeiten und Krankheitsbildern in Verbindung gebracht³⁸.

Bei Mäusen spielt ADAM17 eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung²⁷. Verlust der Funktionalität von ADAM17 durch eine homozygote Mutation des katalytischen Zentrum führt zu embryonaler Letalität^{3,22}. Die überlebenden Mäuse zeigen eine gestörte Entwicklung und teilweise darauffolgende entzündliche Prozesse der Lunge, des Herzens und des Gastrointestinaltrakts, von Augen, Haut und Haaren, des Immunsystems und des ZNS (Zentralen Nervensystems), und einen allgemeinen Hypermetabolismus^{1,3,39}. Neben ubiquitärer ADAM17-Inaktivierung zeigt auch eine nur partiell veränderte ADAM17-Aktivität klinische Manifestationen. Ubiquitäre Herabregulation, aber kein vollständiger Funktionsverlust, führt zu Auffälligkeiten an Herz, Augen, Haut und beeinträchtigter Aufrechterhaltung der Integrität vom Epithel des Gastrointestinaltrakts⁴⁰. Eine genetische Mutation, die zu inaktivem ADAM17 in Keratinozyten führt, beeinflusst die Integrität und Funktionalität der Epidermis und geht mit Defekten in der Hautbarriere und chronischer Inflammation einher⁴¹. All diese klinischen Auffälligkeiten werden mit der Funktion von ADAM17 als TGF- α -*Sheddase* und der damit zusammenhängenden fundamentalen Rolle in EGFR- Signalwegen in Verbindung gebracht^{1,14,27,40-42}.

Auch beim Menschen gibt es, wenn auch nur wenige, Fallberichte von Patienten mit homozygoten Mutationen, die eine Inaktivierung von ADAM17 verursachen. Die Patienten zeigten bei Geburt erhebliche Entwicklungsstörungen und Läsionen von Herz, Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt und Haut^{39,43}. Bei einem Teil der Fälle wurde ein nach wiederkehrender Sepsis letaler Verlauf beschrieben, ein anderer Teil scheint jedoch über Kompensationsmechanismen der fehlenden ADAM17-Aktivität eine gute Überlebensfähigkeit sicherzustellen^{39,43}.

Darüber hinaus ist eine gestörte Regulation von ADAM17 bei vielen weiteren Krankheitsbildern beschrieben. Diese gestörte Regulation ist demnach involviert in Autoimmunerkrankungen und chronischer Inflammation, beispielsweise der Gelenke, der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts^{1,3,13-16,29,44-46}, Karzinogenese und Metastasierung einer Vielzahl verschiedener Tumoren^{1,3,13,14,16,28,29,36,44,47,48}, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Erkrankung, Multiple Sklerose und Morbus

Parkinson^{1,3,13,14,16,29,33,36,37,49}, kardiovaskulären Erkrankungen^{1,3,14,29}, Nierenerkrankungen⁵⁰ und Diabetes mellitus^{13,29,51}.

Bei chronischer Entzündung oder Autoimmunkrankheiten kann eine Hochregulation der ADAM17-Aktivität über die vermehrte Freisetzung von löslichem TNF- α ^{3,14,22,36}, löslichem IL-6-Rezeptor^{22,36,44,52} und teilweise auch TGF- α ³ und L-Selektin³⁶ zum pathologischen Geschehen beitragen. Zusätzlich kann das physiologische Niveau verschiedener inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und Interferon- γ beeinträchtigt sein⁴⁵.

Zur Karzinogenese und Metastasierung verschiedener Tumoren tragen durch erhöhte ADAM17-Aktivität vermehrt freigesetzte Wachstumsfaktoren wie EGFR-Liganden^{14,36,53,54} und ErbB-Liganden^{22,36,55} bei. Überdies leistet die Erhöhung der Expression von ErbB einen Beitrag zur Resistenz gegen gewisse Chemotherapie-Ansätze²². Einzelne Faktoren des EGFR-Signalwegs fungieren in diesem Zusammenhang in bestimmten Tumoren zudem als prognostische Marker²⁸.

Die beachtliche Bedeutung von ADAM17 in den aufgeführten pathologischen Prozessen macht die Metalloprotease zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel.

Die Herstellung verschiedener ADAM17-Inhibitoren und deren Zulassung zur Therapie von beispielsweise rheumatoider Arthritis oder bestimmten Tumoren erwies sich bisher als erfolglos^{30,34,36,46,56}, wobei sich die geringe Wirksamkeit und die mit dem breiten Aufgabenspektrum verbundenen unerwünschten Nebenwirkungen als größte Herausforderungen darstellten^{28,30,34,36}. Besonders auffällig sind in diesem Zusammenhang aufgetretene Hepatotoxizität⁴⁶, wiederkehrende Infektionen von Haut und Gastrointestinaltrakt³⁰ und das *Vascular-Leak-Syndrom*⁴⁷. Eine weitere Schwierigkeit stellt der potenzielle Einfluss von ADAM17-Inhibition auf die unter physiologischen Umständen protektive Funktion von ADAM17 im ZNS dar³⁶.

Auf der anderen Seite wurden in zellbasierten Experimenten und im Mausmodell schon einige erfolgsversprechende Teilergebnisse beschrieben⁵⁷. So hatte bei Mäusen die Inhibition von ADAM17 eine protektive Wirkung beim Endotoxin-induzierten septischen Schock-Syndrom^{24,30}, ein mit Toxin konjugierter monoklonaler ADAM17-Antikörper führte in einer Brustkrebszelllinie zum Absterben der ADAM17-exprimierenden Zellen⁴⁷, ein Inhibitor von Furin, welches für die intrazelluläre Reifung von ADAM17 mitverantwortlich ist⁵⁸, führte zu reduzierter Karzinogenese von Kopf-Hals-Karzinom-Zellen bei Mäusen²⁸ und ein ADAM17-

Inhibitor führte im Mausmodell und bei einer humanen Monozytenzelllinie zu einer Normalisierung verschiedener zuvor hochregulierter inflammatorischer Zytokine⁴⁵.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ADAM17 aufgrund der Involvierung in verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse ein vielversprechendes, aber durch seine Komplexität in Aktivität und Funktionalität auch herausforderndes therapeutisches Ziel darstellt. Von substanzieller Wichtigkeit sind daher das Verständnis und die Erforschung der Regulation von ADAM17.

1.2.2 Regulation

Die Regulation von ADAM17 ist gemäß der erheblichen physiologischen Bedeutsamkeit und des breiten Substratspektrums äußerst vielschichtig und komplex. Bei der Regulation spielen die verschiedenen Domänen von ADAM17, das biochemische Milieu, Eigenschaften des Substrats und weitere äußere Einflüsse eine wichtige Rolle⁵⁹. Die Aktivität von ADAM17 kann unterteilt werden in eine konstitutive katalytische Aktivität, bei der kleine Peptide gespalten werden können, und eine induzierbare und streng regulierte *Shedding*-Aktivität, bei der membrangebundene Substrate prozessiert werden können^{58,60}.

ADAM17 ist aus mehreren Domänen modular aufgebaut^{1,3,4,9,58,61}. N-Terminal besitzt ADAM17 ein Signalpeptid, darauf folgen die Prodomäne, die katalytische Domäne und eine Disintegrin-Domäne. Wie ADAM10, jedoch anders als die übrigen Mitglieder der ADAM-Familie, folgen daraufhin keine cysteinreiche Region und/oder EGF-ähnliche Region, sondern die membranproximale Domäne (MPD) und dann eine membrannahe *Stalk*-Region, welche die Conserved ADAM Seventeen Dynamic Interaction Sequences (CANDIS) enthält. Schließlich folgen eine Transmembran-Region und ein zytoplasmatischer Teil. Die Multidomänenstruktur von ADAM17 ist in **Abbildung 1.2** schematisch dargestellt.

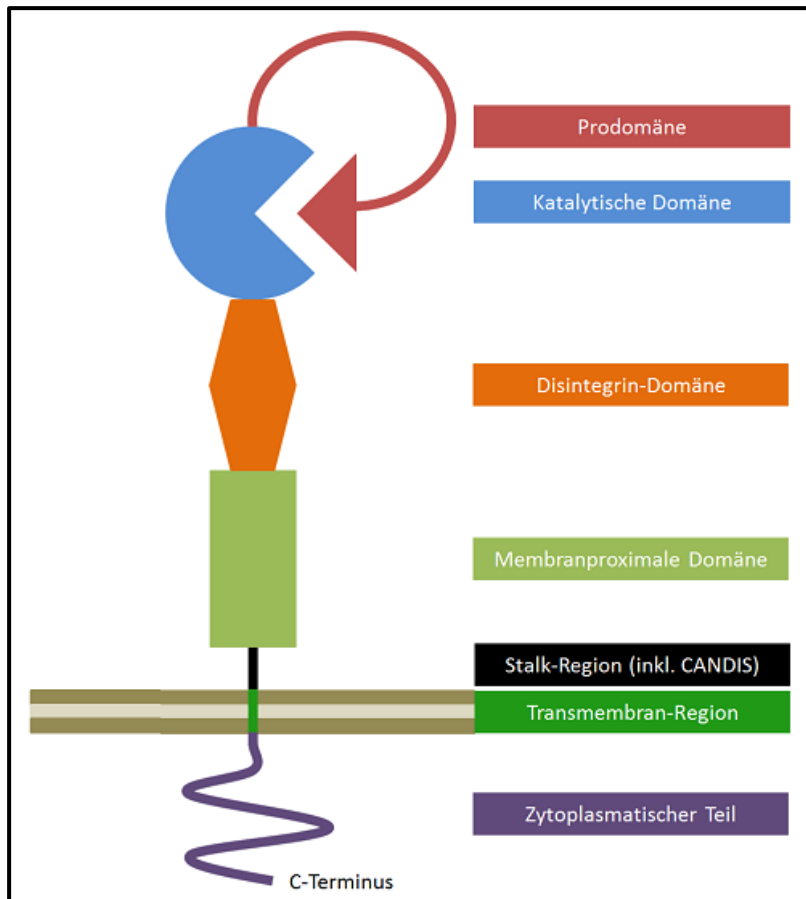


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von ADAM17: Darstellung der Multidomänenstruktur von ADAM17 bestehend aus Prodomäne, katalytischer Domäne, Disintegrin-Domäne, Membranproximaler Domäne, Stalk-Region, Transmembran-Region und zytoplasmatischem Teil.

Die verschiedenen Domänen und deren Regulation und funktionelles Zusammenspiel wurden in großen Teilen bereits sehr detailliert untersucht und beschrieben. Dies gilt jedoch nicht für die Prodomäne von ADAM17.

Bekannt ist, dass die Prodomäne von ADAM17 vermutlich auf der einen Seite der Inaktivierung von ADAM17 während des intrazellulären Reifungsprozesses dient^{62,63}. Ihr *Cystein-Switch* -Motiv könnte dafür verantwortlich sein, an das Zink-Ion im katalytischen Zentrum zu binden^{3,58,64,65} und ADAM17 beim Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Golgi-Apparat in Zymogen-Form zu halten³. Dort wird die Prodomäne dann durch Furin abgespalten^{58,62}. In *In-vitro*-Assays konnte gezeigt werden, dass Meprin β unter bestimmten Bedingungen ebenfalls in der Lage ist, die Prodomäne von ADAM17 abzuspalten⁶⁶. Auf der anderen Seite nimmt die Prodomäne mutmaßlich die Rolle eines Chaperons für ADAM17 ein^{3,58,67} und ist somit für die korrekte Faltung und Expression von funktionellem ADAM17 mitverantwortlich⁶⁷⁻⁶⁹. Die Funktion der Inaktivierung während des

Reifeprozesses und als Chaperon wurde ebenfalls für die Prodomäne von ADAM10 beschrieben⁷⁰. Auch für andere ADAMs konnte bereits gezeigt werden, dass die Prodomäne zur funktionellen Expression⁶⁷ notwendig ist.

Die katalytische Domäne von ADAM17 besitzt ein Zink-Ion im aktiven Zentrum und prozessiert zahlreiche Substrate. Sie ist bei einem Teil des Substratspektrums wie beispielsweise TNF- α oder TNFR2 auch für die Substratspezifität von ADAM17 mitverantwortlich^{25,32}. Auf die Aktivierung von ADAM17 folgt eine Exposition des katalytischen Zentrums, um die *Shedding*-Funktion ausführen zu können⁷¹. Vermutlich liegt ADAM17 bei Bindung an die Prodomäne ebenfalls in dieser das katalytische Zentrum exponierenden Form vor⁶⁷. Außerdem bindet TIMP3, ein physiologisch vorkommender Inhibitor von ADAM17, an das katalytische Zentrum^{6,16,72}. Dabei bindet ein TIMP3-Molekül jeweils an ein Dimer von ADAM17^{58,73}, welches sich jedoch an der Zelloberfläche befinden muss⁷⁴. Dies ist in **Abbildung 1.3** dargestellt. Für TIMP3 konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Mutanten eine höhere Bindungsaffinität und Assoziationsrate zu ADAM17 aufweisen und damit einen potenziellen Inhibitor darstellen könnten^{75,76}.

Die Disintegrin-Domäne von ADAM17 ermöglicht eine Komplex-Bildung mit selektiven Integrinen, wodurch die ADAM17-Aktivität inhibiert werden kann^{58,73} (siehe **Abbildung 1.3**). Diese Interaktion kann als Zell-Zell-Interaktion (*trans*) oder auf derselben Zelle (*cis*) stattfinden³. Zusätzlich fungiert die Disintegrin-Domäne strukturgebend für den extrazellulären Teil von ADAM17 und trägt so zu dessen C-Form und Starrheit bei⁵⁸.

Die membranproximale Domäne (MPD) von ADAM17 besitzt mehrere Aufgaben und kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen – einer flexibleren, offenen Form und einer starren, kompakteren, geschlossenen Form^{58,61}. Der Unterschied dieser beiden Formen liegt in einer Isomerisierung von zwei Disulfidbrücken^{58,73}. Die offene Form entspricht einem aktiven Status von ADAM17 und kann, wie in **Abbildung 1.3** zu sehen ist, durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) in die geschlossene Form überführt werden, wodurch ADAM17 inaktiviert wird^{61,73,77–79}. Die MPD besitzt in diesem Sinne also eine Art Schalterfunktion. Beim Transport durch das ER liegt die MPD vermutlich in offener Form vor, wird aber durch das Chaperon GRP78 vor den ER-ständigen PDIs geschützt⁷⁷.

In der offenen Form vermittelt die MPD die Multimerisierung von ADAM17 an der Zelloberfläche und die Entfernung der Prodomäne vom katalytischen Zentrum⁸⁰. So wird eine regelrechte Aktivität von ADAM17 sichergestellt⁸⁰. Durch verschiedene ADAM17-

Aktivatoren wie beispielsweise Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) kommt es zum Calcium-Einstrom und letztendlich zur Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Zellmembran⁵⁸. Die offene Form der MPD ist in der Lage, an Phosphatidylserin zu binden und damit eine Konformationsänderung von ADAM17 herbeizuführen^{73,81}. Diese Konformationsänderung bringt unter anderem das katalytische Zentrum näher zur Zelloberfläche und damit näher an die Spaltstellen der membrangebundenen Substrate und initialisiert dadurch den Vorgang des *Shedding*^{58,60,81}, wie in **Abbildung 1.3** nachzuvollziehen ist. Außerdem ist die MPD von ADAM17 an der Substraterkennung und -bindung beteiligt^{58,80,82}.

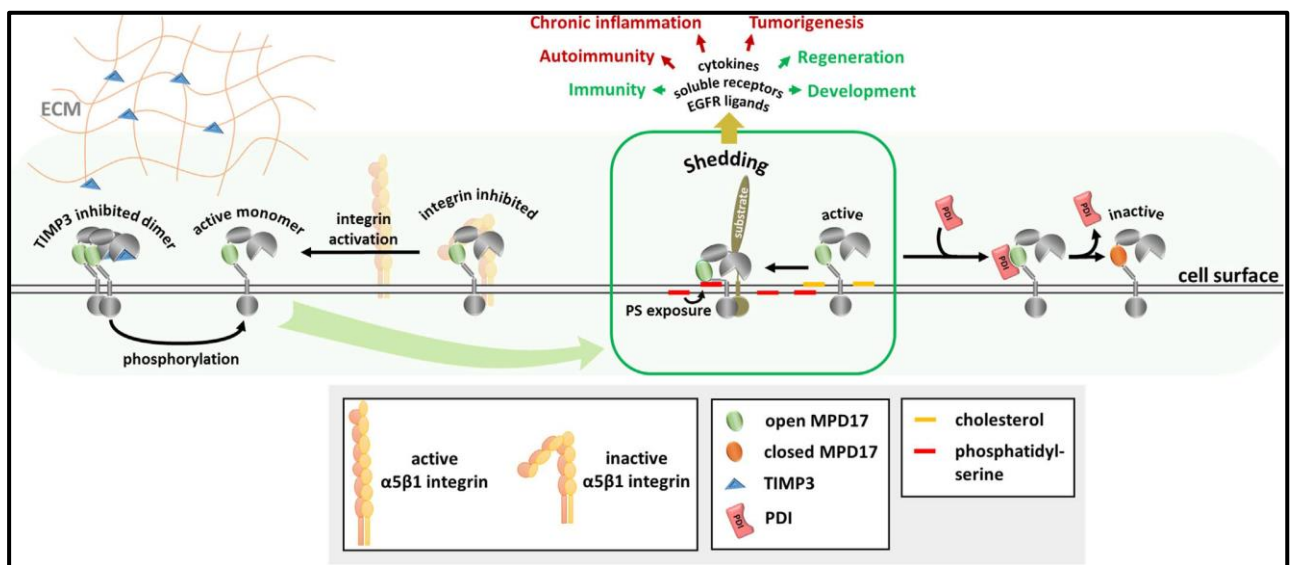


Abbildung 1.3: Verschiedene Zustände von ADAM17 an der Zelloberfläche: Liegt die MPD in der offenen Form vor, kann durch die Erhöhung von Phosphatidylserin bzw. die Reduktion von Cholesterin an der Zelloberfläche die Shedding-Aktivität induziert werden. Bindet Integrin an diesen aktivierbaren Zustand oder dimerisiert ADAM17 bei konsekutiver TIMP3-Bindung, wird ADAM17 inaktiviert. Weiterhin kann die MPD durch PDIs in die geschlossene Form überführt werden, was eine Inaktivierung von ADAM17 zur Folge hat. Übernommen aus ⁵⁸.

Die *Stalk*-Region von ADAM17 ist wichtig für die Substraterkennung und -affinität^{7,32}, beispielsweise bei den Typ-1-Transmembranproteinen IL-6R und IL-1RII^{61,73}, und hat möglicherweise Einfluss auf die Rekrutierung von für die weitere Prozessierung wichtigen Zelloberflächenproteinen³². Sie enthält außerdem die CANDIS-Region, eine 14 Aminosäuren lange, hochkonservierte Region⁶¹, die bei der Interaktion mit Substraten und der Zelloberfläche eine hohe Relevanz besitzt^{58,83}.

Die Transmembran-Region von ADAM17 ist bedeutend für die Reaktion auf gewisse Stimuli von ADAM17⁷¹ und die korrekte *Shedding*-Funktion einiger Substrate von ADAM17^{32,84}. Wird die Transmembrandomäne von ADAM17 beispielsweise durch einen GPI-Anker ersetzt, kann kein *Shedding* mehr von TGF- α , TNF- α oder L-Selektin stattfinden⁸⁴.

Die zytoplasmatische Region von ADAM17 besitzt Bedeutsamkeit in der Aktivierung von ADAM17 über intrazelluläre Signalkaskaden^{32,85}. Liegt ADAM17 als an TIMP3 gebundenes Dimer vor, kann die intrazelluläre Region an mehreren Stellen phosphoryliert werden^{5,58} und zur Monomerisierung von ADAM17, Dissoziation von TIMP3 und damit Aktivierung von ADAM17 führen⁵⁸. Diese Phosphorylierung kann beispielsweise über den Proteinkinase C- und MAP-Kinase-Signalweg eingeleitet werden^{5,86}.

Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus ist das *Trafficking* und die damit verbundene zelluläre Lokalisation von ADAM17^{5,87}. Beim Austritt aus dem ER ist ADAM17 an iRhom2 gebunden^{81,88}. Ohne iRhom2 kann der Reifungsprozess, bestehend aus diesem Austritt und der späteren Abspaltung der Prodomäne, im Golgi-Apparat nicht initialisiert werden und kein reifes ADAM17 an die Zelloberfläche gelangen^{30,83,88,89}. Auch das *Sorting*-Protein Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) trägt zum Transport von ADAM17 an die Zelloberfläche bei⁵⁵.

ADAM17 an der Zelloberfläche ist einem stetigen Umsatz unterzogen⁵⁸. Dabei wird ADAM17 konstitutiv clathrin-abhängig internalisiert⁸¹ und entweder proteolytisch degradiert oder, unter anderem mithilfe von PACS-2, einem Protein-Recycling unterzogen^{55,81}. So befindet sich der Großteil von ADAM17 nicht an der Zelloberfläche, sondern in einem perinukleären Kompartiment^{62,81}.

Die gemeinhin niedrige basale *Shedding*-Rate vieler Substrate von ADAM17 kann durch verschiedene Stimulatoren erhöht werden⁸⁵. Durch manche physiologische Stimulatoren wie Thrombin, Histamin oder Lysophosphatidsäure (LPS)^{7,71} konnte eine Induzierbarkeit des *Sheddings* ohne Überexpression von ADAM17 auf der Zelloberfläche beobachtet werden^{81,90,91}. Bei anderen, teilweise nicht-physiologischen Stimulatoren wie PMA wurde sowohl eine erhöhte Zelloberflächenexpression^{5,81} von ADAM17 als auch eine erhöhte *Shedding*-Rate^{85,90} beobachtet. Auf die erhöhte *Shedding*-Rate und Zelloberflächenexpression von ADAM17 erfolgt daraufhin über eine erhöhte clathrin-abhängige Internalisierung^{81,90} und die Freisetzung von membranständigem ADAM17 in Exosomen⁹² eine Reduzierung der ADAM17-Aktivität^{81,92,93}. Dies entspricht einem negativen Feedback-Mechanismus und sorgt

außerdem dafür, dass die von ADAM17 abgespaltenen Membranproteine quantitativ regeneriert werden können⁹⁰. Weiterhin bietet dies eine Erklärung dafür, dass systemische ADAM17-Überexpression nicht zwangsläufig zu einer erhöhten systemischen ADAM17-Aktivität führt⁹⁴. Beachtlich ist an dieser Stelle, dass exosomal freigesetztes ADAM17 möglicherweise eine *Shedding*-Aktivität an anderen Zellen (*trans*) aufweisen kann⁹².

ADAM17 an der Zelloberfläche befindet sich hauptsächlich in *Lipid Rafts*^{3,5,95}. Die Aktivität von ADAM17 kann dort auf der einen Seite durch den *Lipid-Raft*-Umsatz, der beispielsweise vom Cholesterol-Gehalt (siehe **Abbildung 1.3**) der äußeren Plasmamembran abhängt, kontrolliert werden^{52,83,95}. Auf der anderen Seite gibt es für bestimmte Substrate von ADAM17 Kontrollmechanismen für den Eintritt in *Lipid-Rafts* und somit eine substratspezifische *Shedding*-Regulation⁹⁵. Zudem können die Kolokalisation von ADAM17 mit verschiedenen Tetraspaninen^{5,96} und ein hoher NaCl-Gehalt⁶⁸ an der Zelloberfläche die Aktivität von ADAM17 verringern.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Substrate von ADAM17 einen Einfluss auf deren *Shedding* haben. Außer der eigentlichen Spaltstelle müssen weitere Regionen bestimmter Substrate, wie beispielsweise IL-6R⁹⁷ oder TNF- α ⁶¹, erkannt und gebunden werden⁹⁸. Es gibt also keine klassische *Shedding*-Sequenz⁹⁹. Zusätzlich beeinflussen Substrateigenschaften wie der Redoxstatus⁵, Phosphorylierungen⁵⁸ und die strukturelle Zugänglichkeit⁹⁹ die substratspezifische *Shedding*-Aktivität von ADAM17.

Zusammenfassend lässt sich die Regulation der Aktivität von ADAM17 als ein komplexes Zusammenspiel verschiedener, streng kontrollierter Mechanismen beschreiben. Substrate, Mediatoren, biochemisches Milieu und nicht zuletzt die Multidomänenstruktur von ADAM17 nehmen dabei entscheidende Rollen ein.

Die Multidomänenstruktur, das *Trafficking* und auch die Einflüsse und Aufgaben der einzelnen Domänen von ADAM17 konnten bisher verhältnismäßig detailliert beschrieben und folglich ein grundlegendes Verständnis für diese entwickelt werden. Dies gilt nicht bzw. nur mit großen Einschränkungen für die Prodomäne von ADAM17. Bisher wird der Prodomäne von ADAM17^{13,58,65,67,69} wie auch jener von ADAM10^{70,100} eine Funktion als potenter und selektiver Inhibitor der jeweiligen Metalloprotease zugeschrieben. Der strukturelle Aufbau, explizite Funktion im Reifungsprozess von ADAM17, die weitere Verstoffwechselung nach der Abspaltung von ADAM17 und weitere potenzielle Funktionen und Wirkungsweisen der ADAM17 Prodomäne bleiben bislang jedoch unverstanden.

2 Zielsetzung

Die Prodomäne von ADAM17 ist in ihrer Struktur und in ihrer Funktion bisher zum allergrößten Teil nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es, für ein DNA-Konstrukt, das für eine mutante Form der ADAM17 Prodomäne kodiert, nach Klonierung in einen Expressionsvektor ein geeignetes Expressionssystem und einen adäquaten Reinigungsvorgang zu etablieren. Weiterhin sollen, darauf basierend, zahlreiche Untersuchungen sowohl zur Struktur als auch zur Funktion des gereinigten Proteins ermöglicht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden sind sämtliche verwendeten Materialien aufgeführt.

3.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders gekennzeichnet, stammen alle verwendeten Chemikalien von den Firmen *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, USA) und *Carl Roth* (Karlsruhe, DE).

3.1.2. Medien

Sämtliche verwendeten Medien (**Tabelle 3.1**) wurden für mindestens 30 min bei 120°C autoklaviert.

Tabelle 3.1: Verwendete Medien

Medium		Einwage
LB-Agar	LB-Medium	500 mL
	Agar-Agar (1,5 % w/v)	7,5 g
LB-Medium (Roth Fertigmischung)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	pH	7,0
	ddH ₂ O	ad 1000 mL

3.1.3 Puffer

Alle verwendeten Puffer, die selbstständig angesetzt wurden, sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet. Zum Ansetzen sämtlicher Puffer wurde stets doppelt destilliertes Wasser (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet, zur Einstellung des pH-Wertes 5M NaOH-Lösung und 37% $\text{HCl}_{(\text{aq})}$.

Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer

Puffer		Einwage
ADAM17-Aktivitäts-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	0,30 g
	ZnCl_2 -Lösung (25 mM)	100 μL
	Brij-35 (w/v)	5 mg
	pH	9,0
	ddH ₂ O	ad 100 mL
EDTA-Lösung (0,5 M)	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	37,22 g
	ddH ₂ O	90 mL
	pH	8,0
	ddH ₂ O	ad 200 mL
Elutionspuffer Puffer 2 (10x)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	60,57 g
	NaCl	175,32 g
	Imidazol	170,19 g
	ddH ₂ O	ad 1000 mL
Elutionspuffer Puffer 2 (1x)	Elutionspuffer Puffer 2 (10x)	100 mL
	pH	8,0
	ddH ₂ O	ad 1000 mL
Lämmli-Probenpuffer (5x, nicht-reduzierend)	Glycerin	4,3 mL
	SDS	1,5 g
	TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	3,2 mL
	Bromphenolblau	0,1 g
	ddH ₂ O	2,5 mL
Lämmli-Probenpuffer (5x, reduzierend)	Glycerin	4,3 mL
	Mercaptoethanol	2,5 mL
	SDS	1,5 g
	TRIS-Puffer (1 M, pH 6,8)	3,2 mL
	Bromphenolblau	0,1 g
NAP-Puffer 1	CH_3COOH	7,75 g
	CH_3COONa	9,8 g
	pH	4,5
	ddH ₂ O	ad 200 mL

Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer (fortgesetzt)

Puffer		Einwage
NAP-Puffer 2	CH ₃ COOH	7,75 g
	CH ₃ COONa	9,8 g
	NaCl	3,51 g
	pH	4,5
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 3	CH ₃ COOH	1,83 g
	CH ₃ COONa	23,11 g
	pH	5,5
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 4	CH ₃ COOH	1,83 g
	CH ₃ COONa	23,11 g
	NaCl	3,51 g
	pH	5,5
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 5	NaH ₂ PO ₄	10,6 g
	Na ₂ HPO ₄	33,01 g
	pH	7
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 6	NaH ₂ PO ₄	1,62 g
	Na ₂ HPO ₄	50,45 g
	pH	8
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 7	NaCl	1,6 g
	Na ₂ HPO ₄	288 mg
	KH ₂ PO ₄	48 mg
	KCl	40 mg
	pH	7
	ddH ₂ O	ad 200 mL
NAP-Puffer 8	NaCl	1,6 g
	Na ₂ HPO ₄	288 mg
	KH ₂ PO ₄	48 mg
	KCl	40 mg
	pH	8
	ddH ₂ O	ad 200 mL
Resuspensionspuffer Puffer 1 (10x)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	60,57 g
	NaCl	175,32 g
	Imidazol	13,61 g
	ddH ₂ O	ad 1000 mL
Resuspensionspuffer Puffer 1 (1x)	Resuspensionspuffer Puffer 1 (1x)	100 mL
	pH	8,0
	ddH ₂ O	ad 1000 mL

Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer (fortgesetzt)

Puffer		Einwage
Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (10x)	Tris(hydrxymethyl)aminomethan (TRIS) NaCl CaCl ₂ · 2 H ₂ O ZnCl ₂ -Lösung (25 mM) ddH ₂ O	60,57 g 87,66 g 0,736 g 1 mL ad 1000 mL
Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (1x)	Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (10x) pH ddH ₂ O	100 mL 8,0 ad 1000 mL
TBE-Puffer (10x)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Borsäure Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ddH ₂ O	60,57 g 32,93 g 3,65 g ad 500 mL
TBE-Puffer (1x)	TBE-Puffer (10x) ddH ₂ O	100 mL ad 1000 mL
ZnCl₂-Lösung (25 mM)	ZnCl ₂ ddH ₂ O	3,4 g ad 1000 mL

Alle verwendeten Puffer, die kommerziell erworben wurden, sind in **Tabelle 3.3** zu finden.

Tabelle 3.3: Verwendete kommerzielle Puffer

Puffer	Firma
BamHI Unique Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc.
FastAP Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc.
T4 DNA Ligase Buffer (5x)	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.4 Enzyme

Die für die verschiedenen Restriktionsverdau-Ansätze, die Ligation und die Proteinreinigung verwendeten Enzyme sind in **Tabelle 3.4** aufgelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Enzyme

Enzym	Aktivität	Firma
ADAM17 (rekombinant, human)	>500 pmol/min/μg	Research and Diagnostic Systems Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA)
BamHI	10 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Benzonase Nuclease	250 U/ μL	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc.
NcoI	10 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc.
NdeI	10 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc.
T4 DNA Ligase	1 U/μL	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.5 Plasmide

Bei der Klonierung wurden folgende in **Tabelle 3.5** aufgeführte Vektoren genutzt. Die Vektorkarte vom Vektor *pMA-T* befindet sich im Anhang (Kapitel **6.7 Vektorkarte**).

Tabelle 3.5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Firma
pMA-T	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
pET-28a	Novagen by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)

3.1.6 Primer

Die DNA-Sequenzierung wurde mit folgenden Primern (**Tabelle 3.6**) durchgeführt.

Tabelle 3.6: Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Firma
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Novagen by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	Novagen by Merck Millipore

3.1.7 Kommerzielle Marker

Die verwendeten kommerziellen Marker wurden in **Tabelle 3.7** erfasst.

Tabelle 3.7: Verwendete kommerzielle Marker

Marker	Elektrophorese	Firma
Pierce Prestained Protein MW Marker	SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.8 ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay

Die im ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 3.8** aufgeführt. Das *Fluorogenic Peptide Substrate III* besitzt folgende Sequenz: Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dpa-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂. (Mca: (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl; Dpa: N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl).

Tabelle 3.8: Im ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay verwendete Chemikalien

Chemikalie	Funktion	Firma
Marimastat	ADAM17-Inhibition	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Fluorogenic Peptide Substrate III	ADAM17-Aktivitäts-Messung	Research and Diagnostic Systems Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Transformation

Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurden die verwendeten Plasmide (sowohl das ursprüngliche Konstrukt als auch das umklonierte Plasmid) in den *E. coli*-Stamm *DH5-α* transformiert.

Nach dem Auftauen der Bakterien auf Eis wurden 10 µL DNA zu 50 µL Bakteriensuspension pipettiert (Bakteriendichte $4,8 - 6,4 \cdot 10^8$ / mL; entspricht einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8). Dieser Ansatz wurde 60 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach wurde für 60 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit bei 7°C wurden 500 µL LB-Medium zugegeben und 60 Minuten im *Thermomixer compact* (Eppendorf AG, Hamburg, DE) bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Schließlich wurden 100 µL der Bakteriensuspension zu einem Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/mL) verwendet und die LB-Agarplatte bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2 Mini-Plasmidpräparation

Zur Mini-Plasmidpräparation wurde das Kit *Nucleospin Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel, Düren, DE) verwendet, um größere Plasmidmengen zu gewinnen. Die Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.3 Restriktionsverdau

Das Pipettierschema des Restriktionsverdau des Plasmids lässt sich der **Tabelle 3.9** entnehmen. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Enzyme für 10 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 3.9: Pipettierschema des Restriktionsverdau

Nuklease-freies Wasser	40,3 μL
Puffer BamHI (10x)	6 μL
Enzym BamHI	1,5 μL
Enzym NcoI	3 μL
pMA-T ($\beta=327,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	9,2 μL ($\cong 3,01 \mu\text{g}$)
Gesamt	60 μL

Der Restriktionsverdau des Zielvektors *pET-28a* wurde nach **Tabelle 3.10** zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 7 μL *FastAP Buffer* (10x) und 3 μL *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert, um den Vektor zu dephosphorylieren. Schließlich wurden die Enzyme für 10 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 3.10: Pipettierschema des Restriktionsverdau: Auch der Zielvektor pET-28a wird von den Restriktionsenzymen BamHI und NcoI verdaut.

Nuklease-freies Wasser	47,2 µL
Puffer BamHI (10x)	6 µL
Enzym BamHI	1,5 µL
Enzym NcoI	3 µL
pET-28a ($\beta=1340$ ng/µL)	2,3 µL ($\cong 3,08$ µg)
Gesamt	60 µL

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese der DNA wurden 0,7- (für die Isolation des Zielvektors *pET-28a*) und 2-Prozent-Agarosegele (für die Isolation des gewünschten Inserts) verwendet. Die Zusammensetzung ist in **Tabelle 3.11** aufgeführt.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung Agarosegele

	Agarose	TBE-Puffer (1x)
Agarosegel (0,7%)	0,7 g	100 mL
Agarosegel (2%)	2 g	100 mL

Nach Versetzung der Proben mit dem Ladepuffer *DNA Gel Loading Dye* (6x) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) wurden diese auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 80 Minuten bei 100 V in TBE-Puffer (1x) mit dem *Mini-Sub Cell GT Cell Set* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) durchgeführt. Als Marker wurde *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt.

3.2.5 Gelextraktion

Nach dem Färben wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Daraufhin wurde das Kit *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, DE) nach Herstellerangaben zur DNA-Extraktion verwendet.

3.2.6 Ligation

Die Ligation der DNA-Fragmente (gewünschtes Insert und Zielvektor *pET-28a*) wurde mit der *T4-DNA-Ligase* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) bei 17°C über acht Stunden durchgeführt. Nach Vorgabe einer bestimmten Menge des Zielvektors *pET-28a* (1 µL; $\cong 148,55$ ng) wurden Vektor und Insert in den molaren Verhältnissen 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 gemischt. **Formel 3.1** zeigt, wie sich die Menge an Insert für das Verhältnis 1:1 berechnen lässt.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]}$$

Formel 3.1: Insert: Berechnung der benötigten Insertmasse für ein molares Verhältnis von Zielvektor und Insert von 1:1

Das Insert ist 521 Basenpaare und der Zielvektor 5271 Basenpaare lang. Das entspricht einem Verhältnis von $521/5271 \approx 0,099$. Aus Gleichung 1 ergibt sich nun bei einer gegebenen Menge des Zielvektors von $\sim 148,55$ ng für ein molares Verhältnis von 1:1 eine Menge an Insert von 14,71 ng. Tabelle 4 zeigt das Pipettierschema für die verschiedenen molaren Verhältnisse 1:1, 1:3, 1:5 und 1:10. Zusätzlich lassen sich aus **Tabelle 3.12** die zupipettierten Mengen an *T4-DNA-Ligase*, *T4 DNA Ligase Buffer (5x)* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) und Nuklease-freiem Wasser entnehmen.

Tabelle 3.12: Pipettierschemata der Ligationsansätze für verschiedene molare Verhältnisse von Vektor zu Insert

Molares Verhältnis Vektor : Insert	1:1	1:3	1:5	1:10
pET-28a ($\beta=148,55 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
T4 DNA Ligase Buffer (5x)	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
T4-DNA-Ligase	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Insert ($\beta=10,28 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	1,43 μL	4,29 μL	7,15 μL	14,3 μL
Nuklease-freies Wasser	14,57 μL	11,71 μL	8,85 μL	1,7 μL
Gesamt	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

Nach acht Stunden wurde die Ligase bei 80°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der Ligationsansatz mit 3 μL des Restriktionsenzym *NdeI* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. *NdeI* schneidet den Zielvektor *pET-28a* an einer Stelle, die bei durch *BamHI* und *NcoI* korrekt verdauten Zielvektoren herausgetrennt wurde. Somit wurden aus dem Ligationsansatz Vektoren entfernt, die nicht das gewünschte Insert enthielten. *NdeI* wurde ebenfalls bei 80°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert.

3.2.7 Transformation in *E. coli Rosetta 2* und *E. coli BL21 pLysS*

Als Expressionsstämme wurden die chemisch kompetenten Bakterienstämme *E. coli Rosetta 2* und *E. coli BL21 pLysS* verwendet, in die mittels Transformation die Ziel-DNA eingebracht wurde.

Nach dem Auftauen der Bakterien auf Eis wurden 10 μL DNA zu 50 μL Bakteriensuspension pipettiert. Dieser Ansatz wurde 60 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach wurde für 60 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit bei 7°C wurden 500 μL LB-Medium zugegeben und 60 Minuten im *Thermomixer compact* (Eppendorf AG, Hamburg, DE) bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Schließlich wurden 100 μL der Bakteriensuspension zu einem Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) verwendet und die LB-Agarplatte bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Nach Gewinnung größerer Plasmidmengen durch eine weitere Mini-Plasmidpräparation wurde eine Sequenzierung der Plasmide von der Firma GATC-BioTech AG (Konstanz, DE) mit den Primern *T7* (Sequenz TAATACGACTCACTATAGGG; Novagen by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)) und *pET-RP* (Sequenz CTAGTTATTGCTCAGCGG; Novagen by Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)) durchgeführt, um eine korrekte Umklonierung sicherzustellen.

3.2.9 Expression in LB-Medium

Falls nicht anders beschrieben, wurden die verwendeten Bakterienkulturen jeweils in LB-Medium bei 160 rpm und 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Je nach Resistenz, wurde Antibiotikum zur Kultur gegeben - bei vorliegender Ampicillin-Resistenz 100 µg/mL Ampicillin, bei Kanamycin-Resistenz 30 µg/mL Kanamycin. Sogenannte Übernachtskulturen wurden hierbei jeweils nach Inokulation von 50 mL LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm für 16 Stunden inkubiert. Sogenannte Expressionskulturen wurden jeweils nach Inokulation von LB-Medium (80mL, 1 L, 1,6 L oder 2 L) mit dicht bewachsener Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:100 bis zum Erreichen einer optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) von 0,6 – 0,9 inkubiert. Anschließend wurde zum Zeitpunkt T_0 1 mL Probe zur Analyse mittels diskontinuierlicher *SDS-Page* abgenommen. Mit den ersten Expressionskulturen (je 80 mL pro Expressionsstamm) wurde ein Expressionstest durchgeführt, um die bestmöglichen Expressionsbedingungen zu ermitteln. Bei den später verwendeten Expressionskulturen wurden diese Expressionsbedingungen durchgehend angewendet, sie wurden also auf 18°C gekühlt, mit 0,2 mM *IPTG* induziert und bei 18°C und 160 rpm in einem Schüttelinkubator für 18 Stunden inkubiert. Es wurden zu den Zeitpunkten T_1 , T_2 , T_3 , T_6 und T_{18} (also nach 1, 2, 3, 6 und 18 Stunden Inkubationszeit) die optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) bestimmt und weitere Proben entnommen. Das abzunehmende Volumen, um eine vergleichsweise Bakterienzahl in allen Proben zu erreichen, errechnete sich aus **Formel 3.2.**

$$\frac{OD_{600;T_0} \times 1 \text{ mL}}{OD_{600;T_x}} = V_{T_x} [\text{mL}]$$

Formel 3.2: Volumen: Berechnung des abzunehmenden Volumens V_{T_x} an Bakteriensuspension zum jeweiligen Zeitpunkt T_x

Nach 18 Stunden wurden die Bakterien bei 4°C und 5311 g zentrifugiert und das entstandene Pellet bei -20°C bis zur Reinigung eingefroren.

3.2.10 Expressionstest

Nach der Transformation der Expressionsstämme *E. coli Rosetta 2* und *E. coli BL21 pLysS* mit dem Zielplasmid wurden jeweils 80 mL LB-Medium mit 80 µL/mL Kanamycin mit je 800 µL Übernachtskultur des jeweiligen Stammes inokuliert und in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 160 rpm inkubiert.

Nach dem Erreichen einer optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) von 0,6 – 0,7 wurden die Kulturen von 80 mL in jeweils 20 mL - Ansätze unterteilt. Die verschiedenen Ansätze wurden mit 0,2 mM bzw. 2 mM *IPTG* induziert, bei 18°C bzw. 37°C inkubiert, und nach sechs Stunden bzw. 18 Stunden geerntet. Insgesamt wurden somit pro Bakterienstamm acht Expressionsbedingungen getestet, die sich jeweils aus unterschiedlicher Stoffmengenkonzentration an *IPTG*, unterschiedlicher Inkubationstemperatur und unterschiedlicher Inkubationszeit zusammensetzen.

Nach Ernten der verschiedenen Ansätze wurden diese bei 4°C und 5311 g für 30 Minuten zentrifugiert, und anschließend die Pellets in 10 mL Puffer 1 resuspendiert. Die Suspensionen wurden auf Eis zehnfach mit einer Amplitudenleistung von 35% für je eine Minute mit einem Intervall von 30 Sekunden mit dem *Sonopuls HD 2200* (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE) sonifiziert. Die entstandenen Lysate wurden zur Bereinigung von unlöslichen Bestandteilen erneut für 30 Minuten bei 4°C und 5311 g zentrifugiert und schlussendlich mittels *Filtropur S 0.2* (Sarstedt, Nümbrecht, DE) steril filtriert. Von jedem so vorbehandelten Lysat wurde eine Probe entnommen und über *SDS-Page* analysiert.

3.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die untersuchten Proteine wurden zur Größenanalyse per diskontinuierlicher *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* nach Lämmli (nach Lämmli, 1970) aufgetrennt. Zur Vorbereitung wurden die Proteinproben nach Zugabe von Lämmli-Probenpuffer (reduzierend oder nicht-reduzierend) für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Analyse dienten 15%-*SDS*-Gele (Zusammensetzung siehe **Tabelle 3.13**) und das System *Mini-Protean III Cell* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf, DE). Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, 40-50 mA für 75 Minuten.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung 15%-SDS-Gel

	Sammelgel 7,5%	Trenngel 15%
Wasser (Millipore)	1,225 mL	1,4 mL
0,5 M TRIS pH 6,8	0,625 mL	-
0,5 M TRIS pH 8,8	-	1,6 mL
Acrylamid 30 %	0,625 mL	3 mL
10 % - SDS	25 µL	60 µL
TEMED	2,5 µL	6 µL
APS 10 %	25 µL	100 µL
Gesamt	2,528 mL	6,166 mL

3.2.12 Proteinreinigung

Die bei -20°C gelagerten Pellets der Expressionskulturen wurden in 45 mL Puffer 1 resuspendiert. Zusätzlich wurden eine Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail (*cOMplete*, Mini Protease Inhibitor Tablets, Roche, Basel, Schweiz) und 25 U/mL *Benzonase Nuclease* (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) hinzugegeben. Die Suspensionen wurden auf Eis zehnfach mit einer Amplitudenleistung von 35% für je eine Minute mit einem Intervall von 30 Sekunden mit dem *Sonopuls HD 2200* (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE) sonifiziert. Die entstandenen Lysate wurden zur Bereinigung von unlöslichen Bestandteilen für 60 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und schlussendlich mittels *Filtropur S 0.2* (Sarstedt, Nümbrecht, DE) steril filtriert.

Die Aufreinigung der vorbereiteten Lysate wurde mit dem *ÄKTApurifier-System* (GE Healthcare, München, DE) durch Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

Die Affinitätschromatographie über eine *HisTrap FF Crude Säule* (GE Healthcare, München, DE) erfolgte mit dem Resuspensionspuffer Puffer 1 und dem Elutionspuffer Puffer 2.

Die folgende Größenausschlusschromatographie über eine *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade* Säule (GE Healthcare, München, DE) erfolgte mit Puffer 3 als Resuspensions- und Elutionspuffer.

Zur Verhinderung der Ausbildung von Disulfidbrücken wurden die nach der Größenausschlusschromatographie gesammelten Fraktionen mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) oder 25 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Reduktionsmittel versetzt.

Um die Proteinkonzentration der Fraktionen einzustellen bzw. zu erhöhen, wurde die Ultrafiltrationseinheit *Vivaspin 20, 10000 Dalton MWCO PES* (Sartorius AG, Göttingen, DE) verwendet. Die Proteinlösung wurde in der Ultrafiltrationseinheit bei 4°C und 5311 g bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration zentrifugiert. Im Intervall von drei Minuten wurde die Konzentration der Proteinlösung mittels *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt.

3.2.13 UV-Spektrum

Messungen von Optischer Dichte und UV-Spektren von DNA- oder Proteinlösungen wurden mit dem *Hitachi U-2001 UV/Vis Spectrophotometer* (Hitachi Ltd. Corporation, Chiyoda, JP) gegen den entsprechenden Puffer bzw. das entsprechende Medium als Leerwert aufgenommen. Bei Proteinlösungen wurde über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (**Formel 3.3**) anhand der gemessenen Extinktion E_λ und des spezifischen Extinktionskoeffizienten ε_λ die Konzentration c berechnet.

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda \times c \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] \times d[\text{m}]$$

Formel 3.3: Lambert-Beer'sches Gesetz: Berechnung der Extinktion E_λ aus dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ε_λ , der Konzentration c und der Schichtdicke d .

3.2.14 Massenspektrometrische Analyse

Eine Probe der Mutante ADAM17 Prodomäne mit einer Konzentration von 100 µg/mL im Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (1x) wurde von der Arbeitsgruppe *Systematische Proteomics und Bioanalytik* des Instituts für experimentelle Medizin der CAU Kiel massenspektrometrisch analysiert. Der Bericht der massenspektrometrischen Analyse lässt sich im Anhang (Kapitel **6.9 Bericht Massenspektrometrische Analyse**) nachvollziehen.

3.2.15 Zirkulardichroismus

Es wurde ein CD-Spektrum aufgenommen, um Aussagen über die Sekundärstrukturelemente des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne treffen zu können. Die Aufnahme des CD-Spektrums erfolgte mit dem *Jasco 720 Circular Dichroism Spectropolarimeter* (Jasco Inc., Easton, Maryland, USA) in Quarzglas-Küvetten (Schichtdicke 5 mm; Hellma, Müllheim, DE) bei einer spektralen Bandbreite von 2 nm im Bereich 200 nm bis 250 nm. Die Elliptizität des im CD-Spektrum betrachteten Proteins lässt sich mit **Formel 3.4** berechnen.

$$[\theta]_\lambda^{\text{MRW}} [\text{deg}] = \frac{\text{MRW}}{100} \times \frac{\theta_\lambda [\text{deg}]}{d [\text{dm}] \times c \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right]}$$

Formel 3.4: Elliptizität: Berechnung der Elliptizität aus dem mittleren Aminosäuregewicht des Proteins MRW, der gemessenen Elliptizität θ_λ , der Schichtdicke der Küvette d und der Konzentration des Proteins c .

3.2.16 Thermostabilität

Die thermische Stabilität des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne wurde untersucht, um zu beobachten, wann eine Denaturierung des Proteins eintritt, bei welcher Gradzahl dies geschieht, und um Rückschlüsse darüber zu ziehen, ob das Protein nach seiner Proteinfaltung in der korrekten dreidimensionalen Raumstruktur vorliegt.

Dazu wurde eine Probe der Mutante ADAM17 Prodomäne (in Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (1x)) in einer Quarzglas-Küvette (Schichtdicke 1 mm; Hellma, Müllheim, DE) bei einer Temperaturerhöhung von 1 °C/min von 20 °C auf 95 °C erwärmt, während ein CD-Spektrum in Abhängigkeit zur Temperatur bei einer festgelegten Wellenlänge von 222 nm aufgenommen wurde. Die Aufnahme erfolgte mit dem *Jasco 720 Circular Dichroism Spectropolarimeter* (Jasco Inc., Easton, Maryland, USA).

3.2.17 Dialyse

Zur Entfernung des Imidazol aus dem Eluat der Affinitätschromatographie wurde mit den einzelnen Fraktionen eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurde die Fraktion zu je 5 mL in einen Dialyseschlauch (*ZelluTrans*, Carl Roth, Karlsruhe, DE) mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10000 kDa gefüllt, der Dialyseschlauch in das Tausendfache an Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (1x) gelegt und für 20 h bei 4°C mit dem Magnetrührer *RCT basic* (IKA GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, DE) mit 750 Umdrehungen/min gerührt. Nach 10 h wurde der Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3 (1x) einmal erneuert.

3.2.18 Pufferaustausch

Die Stabilität der Mutanten ADAM17 Prodomäne sollte in verschiedenen Puffern mit unterschiedlichem Puffersystem, pH-Wert und Salzanteil beobachtet werden. Zum Pufferaustausch wurden *illustra NAP* Säulen (GE Healthcare, München, DE) verwendet. Als Elutionspuffer wurden die Puffer NAP-Puffer 1 – 8 verwendet.

3.2.19 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Um eine weitere Reinigung der bei der Größenausschlusschromatographie gewonnenen Fraktionen vorzunehmen, wurde eine Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) durchgeführt. Außerdem wurde so versucht, das Protein Mutante ADAM17 Prodomäne zu stabilisieren bzw. zuvor aufgetretene Aggregationen zu verhindern.

Für die RP-HPLC wurde das *Prominence-System* (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, DE) genutzt mit einer *Multohigh-Bio-200-C18 5 μ Säule* (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, DE) und den Laufmitteln H₂O/ 0,1 % *TFA* und Acetonitril/ 0,1 % *TFA*. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde zur Trennung der Gradient an Acetonitril um 0,6 Prozentpunkte/min erhöht. Das verwendete Programm ist in **Abbildung 3.1** zu finden.

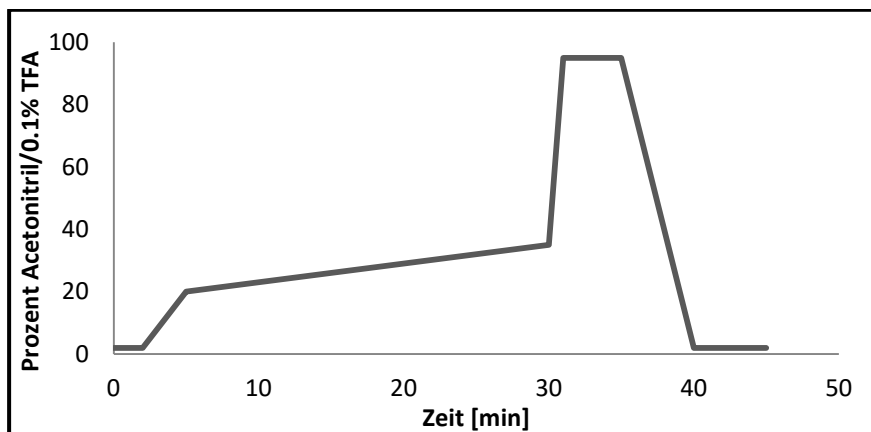


Abbildung 3.1: RP-HPLC-Programm: Die Kurve beschreibt den Acetonitril-Gradienten in Abhängigkeit zur Zeit [min]; Erhöhung des Gradienten während der Elutionsphase (5 min bis 30 min) um 0,6 Prozentpunkte/min.

3.2.20 Enzym-Aktivitäts-Assay

Der ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay wurde in einer schwarzen 96-Well-Platte (*Corning black flat bottom 96 well plate*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) bei 37 °C durchgeführt und gemessen. Die Wells wurden nach dem Pipettierschema aus **Tabelle 3.14** befüllt.

Tabelle 3.14: Pipettierschema zum ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay

	1 (Kontrolle)	2 (Kontrolle)	3	4	5
ADAM17-Lösung (0,4 ng/μL)	50 μL (≅1,92 nM)	50 μL (≅1,92 nM)	50 μL (≅1,92 nM)	50 μL (≅1,92 nM)	50 μL (≅1,92 nM)
Fluorogenic Peptide Substrate III	50 μL (≅10 μM)	50 μL (≅10 μM)	50 μL (≅10 μM)	50 μL (≅10 μM)	50 μL (≅10 μM)
Marimastat (5 mM)	-	2 μL (≅ 50 μM)	-	-	-
Mutante ADAM17 Prodomäne	-	-	10 nM	100 nM	1 μM
ADAM17-Aktivitäts- Puffer	ad 200 μL	ad 200 μL	ad 200 μL	ad 200 μL	ad 200 μL

Das *Fluorogenic Peptide Substrate III* wurde zuletzt und erst wenige Minuten vor der durchgeführten Messung zugegeben.

Schließlich wurde mit dem *Tecan Infinite F200 Pro* (Tecan Group AG, Männedorf, CH) mit der Software *Magellan – Data Analysis Software V7.1* (Tecan Group AG, Männedorf, CH) die Platte bei Wellenlängen von 320 nm bis 405 nm für 30 Minuten ausgelesen.

4 Ergebnisse

4.1 Konstrukt der ADAM17 Prodomäne (Mutante)

Im Folgenden soll das Konstrukt der verwendeten ADAM17 Prodomäne dargestellt werden. Dazu werden sowohl das Plasmid als auch die Aminosäuresequenz betrachtet und mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen.

4.1.1 Plasmid

Zur Herstellung des rekombinanten Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne wurde ein konstruiertes, für dieses Protein kodierendes Plasmid genutzt. Das verwendete Plasmid zur Herstellung der rekombinanten Mutanten ADAM17 Prodomäne hat die in **Abbildung 4.1** aufgeführte DNA-Sequenz.

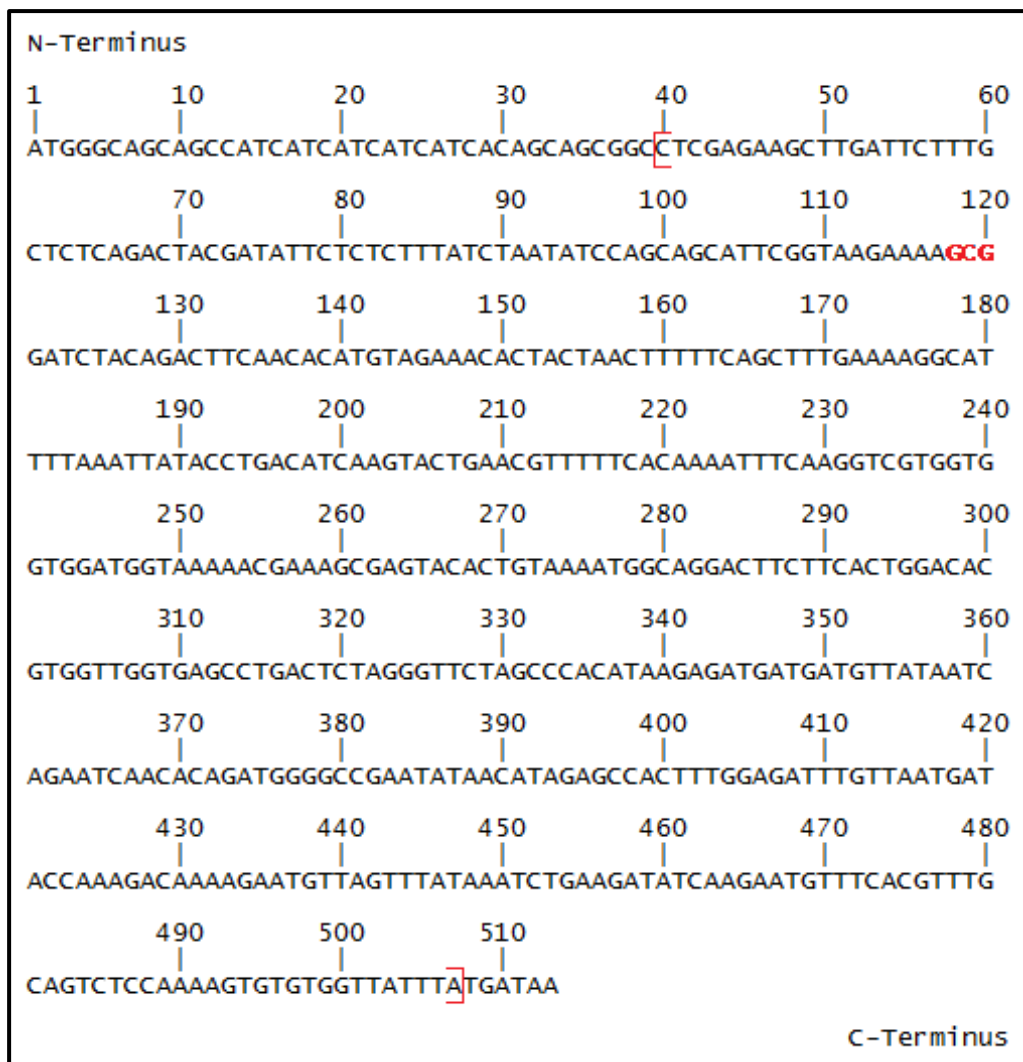


Abbildung 4.1: DNA-Sequenz der Mutante ADAM17 Prodomäne: In roten Klammern der Teil der Sequenz, der der Wildtyp-DNA entspricht, in roter Schrift die zur Mutation Arg40-Ala führenden Nukleinsäuren.

Eine für einen *Hexahistidin-Tag* codierende DNA-Sequenz ist in die codierende DNA-Sequenz des rekombinanten Proteins hinter das Start-Codon (N-terminal) eingefügt.

Zum Vergleich ist in **Abbildung 4.2** ein Ausschnitt der DNA-Sequenz von Wildtyp-ADAM17 gezeigt, der für die Prodomäne kodiert.

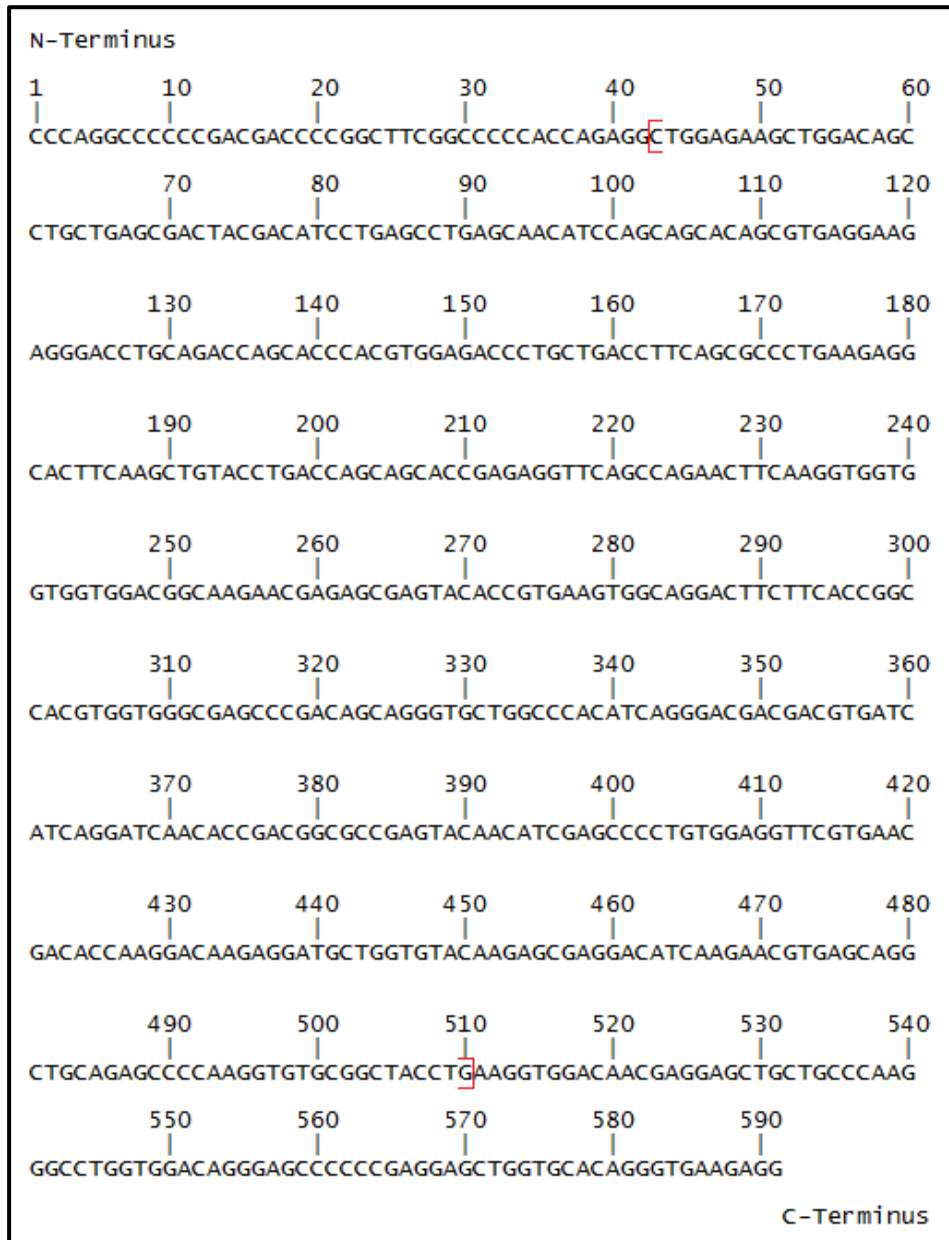


Abbildung 4.2: Wildtyp-DNA-Abschnitt, der für die Prodomäne kodiert: In roten Klammern der Teil der Sequenz, der mit der DNA-Sequenz der Mutanten ADAM17 Prodomäne übereinstimmt.

4.1.2 Aminosäuresequenz

Aus der im Kapitel **4.1.1 Plasmid** beschriebenen DNA-Sequenz des konstruierten Plasmids ergibt sich nach Translation die in **Abbildung 4.3** dargestellte Aminosäuresequenz der Mutanten ADAM17 Prodomäne.

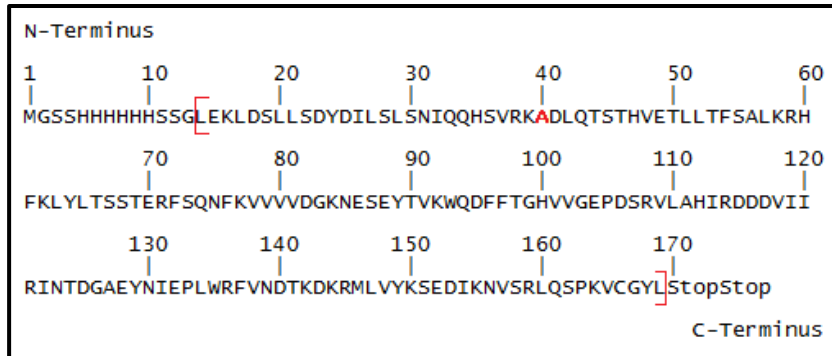


Abbildung 4.3: Aminosäuresequenz der Mutante ADAM17 Prodomäne: In roten Klammern der mit der Wildtyp-Sequenz übereinstimmende Teil, in roter Schrift die eingebrachte Mutation Arg40-Ala.

Chemische und physikalische Grundinformationen zum Protein Mutante ADAM17 Prodomäne befinden sich im Anhang (Kapitel **6.6 Eigenschaften der Mutante ADAM17 Prodomäne**).

Am N-Terminus der Mutanten ADAM17 Prodomäne befindet sich der *Hexahistidin-Tag* (Aminosäuren 5-10). Zudem ist an Position 40 Arginin durch Alanin ersetzt; dies soll die Spaltung der Prodomäne durch Furin verhindern.

Zum Vergleich ist in **Abbildung 4.4** die Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins aufgeführt.

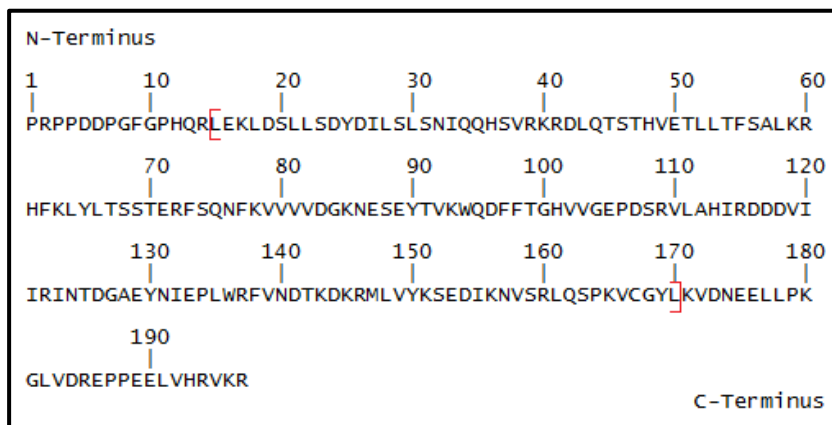


Abbildung 4.4: Wildtyp-Aminosäuresequenz der ADAM17 Prodomäne: In roten Klammern der Teil der Aminosäuresequenz, der mit der Aminosäuresequenz der Mutanten ADAM17 Prodomäne übereinstimmt.

4.2 Klonierung

Zur Herstellung des rekombinanten Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne wurde der kodierende DNA-Abschnitt aus dem bestellten Plasmid mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten, per Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert, und schließlich per Ligation in den Expressionsvektor *pET-28a* eingebracht. Danach wurde durch einen weiteren Restriktionsverdau dafür Sorge getragen, dass die Expressionsvektoren auch tatsächlich den DNA-Abschnitt enthalten, welcher für die Mutante ADAM17 Prodomäne kodiert.

4.2.1 Restriktionsverdau

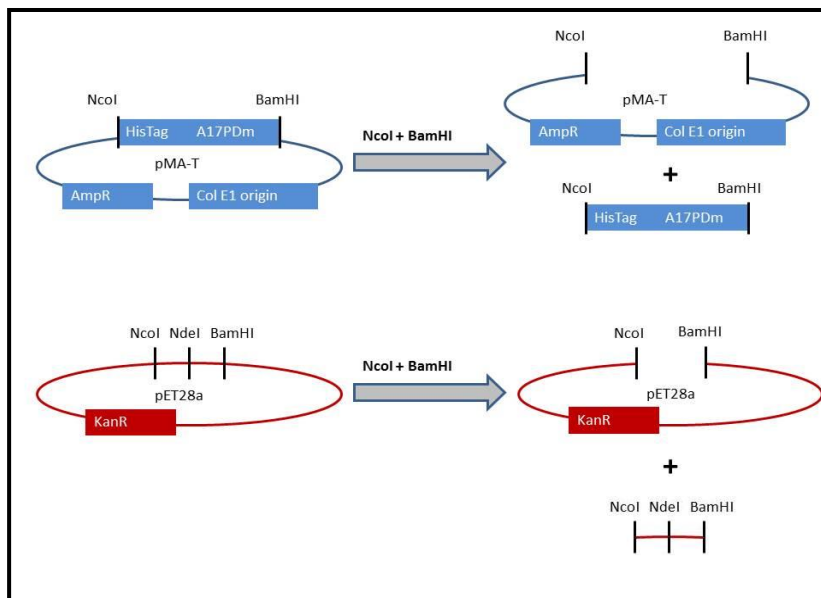


Abbildung 4.5: Schema des Restriktionsverdau: Sowohl das gelieferte Plasmid pMA-T als auch das Plasmid pET-28a wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und NcoI verdaut. Die blaue Domäne „HisTag A17PDm“ stellt den für die Mutante ADAM17 Prodomäne codierenden Teil dar.

Die Lieferung des gewünschten Konstruktes erfolgte im Vektor *pMA-T* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Nach einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NcoI*, welcher in **Abbildung 4.5** schematisch dargestellt ist, wurden die verschiedenen Ansätze des Verdau auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

4.2.2 Agarose – Gelelektrophorese

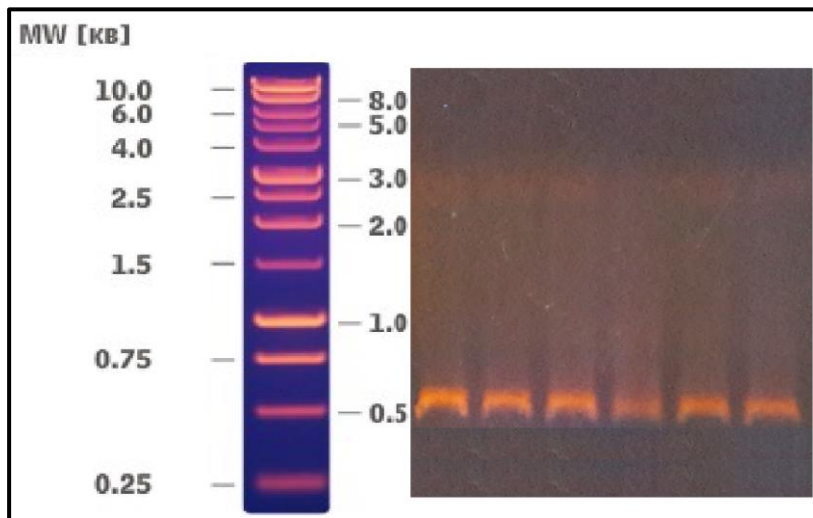


Abbildung 4.6: Restriktionsverdau des Vektors pMA-T: 2% Agarosegel, 80 min bei 100 V, Marker in kb; es wurden die Restriktionsenzyme BamHI und NcoI verwendet. In allen Ansätzen ist der DNA-Abschnitt für die Mutante ADAM17 Prodomäne durch eine starke Bande bei ca. 500 kb zu erkennen.

Das Agarose-Gel, welches in **Abbildung 4.6** dargestellt ist, zeigt in jedem Ansatz des Restriktionsverdau starke Banden bei etwas mehr als 500 Basenpaaren, bei welchen es sich um den bestellten und verdauten DNA-Abschnitt, der für die Mutante ADAM17 Prodomäne (521 Basenpaare) kodiert, handelt.

4.2.3 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die Banden des Agarose-Gels wurden unter UV-Licht mit dem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Nachfolgend wurde das gewünschte DNA-Fragment erfolgreich mit dem *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, DE) extrahiert. Das UV-Spektrum der gewonnenen DNA-Probe ist in **Abbildung 4.7** dargestellt. Beim 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, lässt sich ein lokales Maximum beobachten.

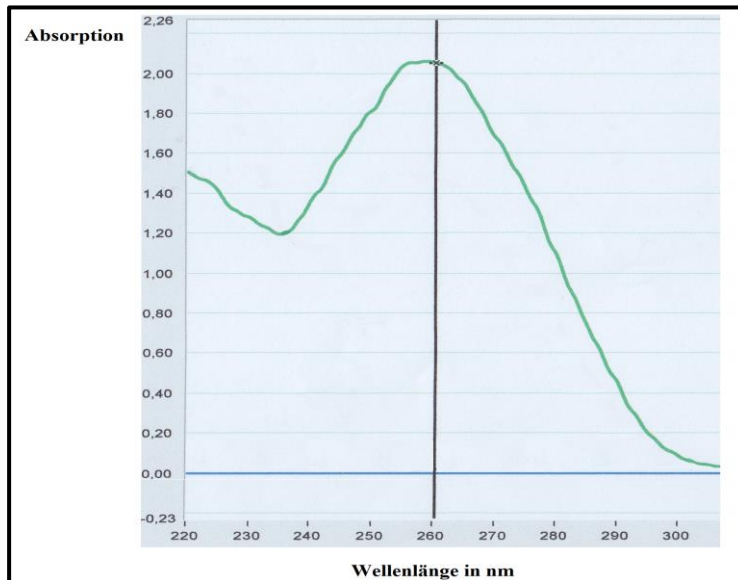


Abbildung 4.7: UV-Spektrum der aus Agarosegelen isolierten DNA: Messung der Absorption in Abhängigkeit zur Wellenlänge; bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm ist ein lokales Maximum zu beobachten.

4.2.4 Ligation

Nach der Gelextraktion wurde die Ziel-Gen-DNA mittels *T4-Ligase* in den Zielvektor *pET28a* eingebracht. **Abbildung 4.8** zeigt das Prinzip der Umklonierung des für die Mutante ADAM17 Prodomäne codierenden DNA-Abschnitts in den Vektor *pET-28a*.

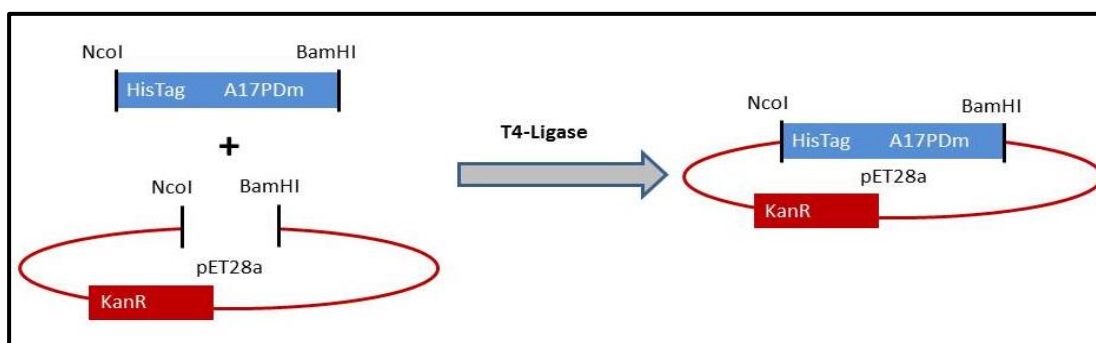


Abbildung 4.8: Schema der Ligation: Der Ligationsansatz ist schematisch dargestellt. Mittels der T4-Ligase wird der für die Mutante ADAM17 Prodomäne codierende Abschnitt in den Zielvektor pET28a kloniert.

4.2.5 Weiterer Restriktionsverdau als Kontrolle (Verhinderung Re-Ligation)

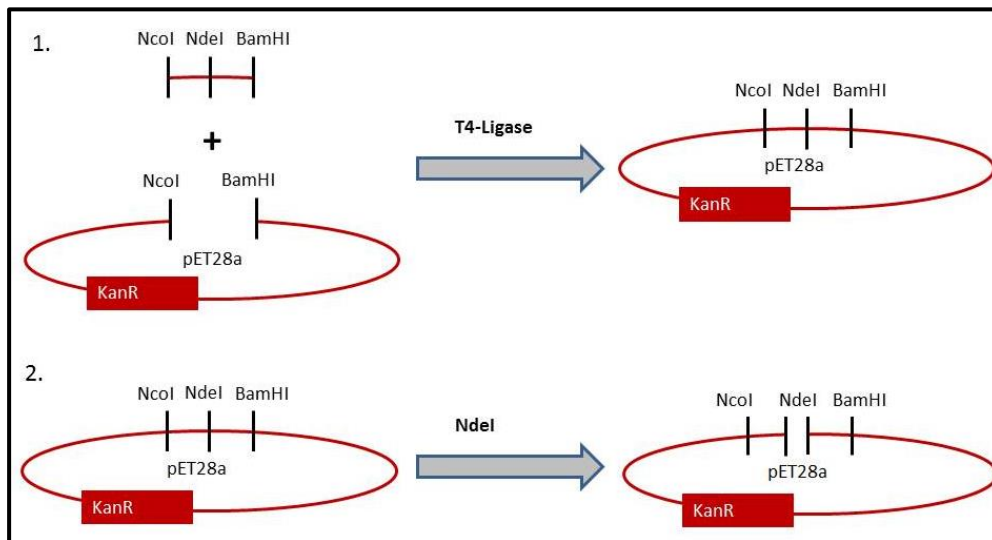


Abbildung 4.9: Schema des zusätzlichen Kontroll-Restriktionsverdau: Es besteht die Möglichkeit, dass der verdaute Zielvektor pET-28a nach der Ligation nicht das gewünschte Insert enthält sondern seinen ursprünglichen DNA-Abschnitt. *NdeI* verdaut diesen religierten Vektor und verhindert somit, dass er in angewachsenen Klonen enthalten ist.

Der Ligationsansatz wurde nach Inaktivierung der Ligase mit *NdeI*, einem weiteren Restriktionsenzym, versetzt. Dieses schneidet nur den Vektor, der zuvor nicht verdaut bzw. religiert wurde, da seine Spaltstelle im von *NcoI* und *BamHI* entfernten DNA-Abschnitt liegt. Dies ist in **Abbildung 4.9** schematisch dargestellt. So wird nach der Transformation sichergestellt, dass angewachsene Klone auch tatsächlich das gewünschte Insert enthalten und nicht einfach *pET28a* ohne eingebrachte Ziel-DNA.

4.3 Vervielfältigung und Expression des Expressionsvektors

Zur Gewinnung größerer Mengen des Expressionsvektors wurde dieser zunächst in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Für eine erfolgreiche Expression des Zielproteins wurde das Plasmid schließlich in zwei bakterielle Expressionsstämme transformiert.

4.3.1 Transformation in *E. coli DH5α*

Der neue, das Insert beinhaltende Vektor wurde mittels Transformation in den Bakterienstamm *E. coli DH5α* eingebracht.

4.3.2 Plasmidpräparation

Anschließend wurde eine Mini-Prep zur Gewinnung größerer Mengen der Plasmid-DNA durchgeführt. Das UV-Spektrum der gewonnenen DNA-Lösung in **Abbildung 4.10** zeigt ein lokales Maximum bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Der Erfolg der Umklonierung wurde per Sanger-Sequenzierung validiert. Die Sequenzierungsergebnisse sind im Anhang (Kapitel **6.8 DNA-Sequenzierungsergebnisse**) dargestellt.

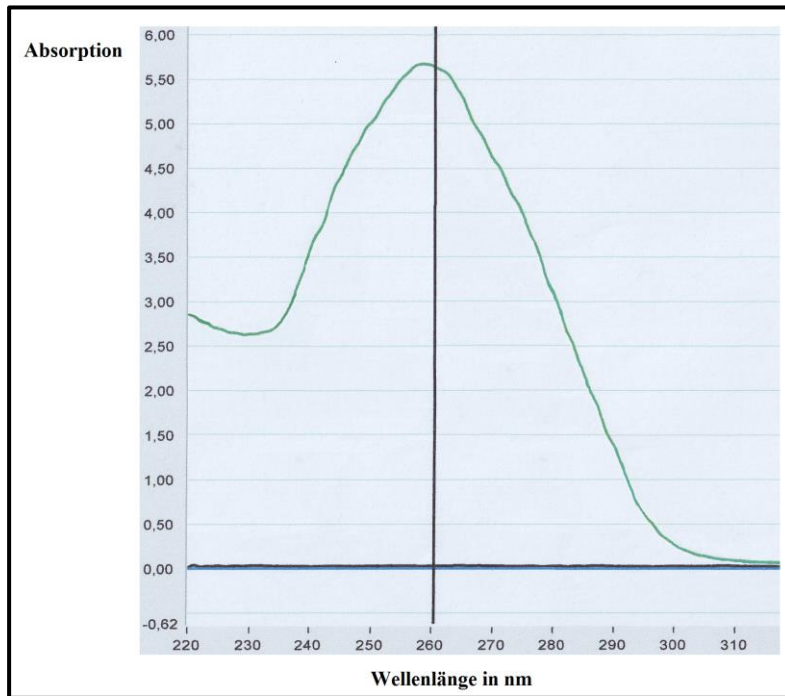


Abbildung 4.10: UV-Spektrum der amplifizierten DNA: Messung der Absorption in Abhängigkeit zur Wellenlänge; bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm ist ein lokales Maximum zu beobachten.

4.3.3 Transformation in Expressionsstämme *E. coli Rosetta 2* und *E. coli BL21 pLysS*

Schließlich wurde die gewonnene Ziel-DNA per Transformation in die Expressionsstämme *E. coli Rosetta 2* und *E. coli BL21 pLysS* eingebracht. Die Bakterienstämme zeigten auf einer mit Kanamycin (100 $\mu\text{g/mL}$) behandelten LB-Agarplatte gutes Wachstum, was dafür spricht, dass der Expressionsvektor *pET-28a* samt der Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin erfolgreich eingebracht wurde. Mit beiden Expressionsstämmen wurde ein Expressionstest durchgeführt.

4.4 Expression

Um die bestmögliche Ausbeute an Protein zu erreichen, wurde mit beiden Expressionsstämmen ein Expressionstest durchgeführt. Anschließend wurde per *SDS-PAGE* die Löslichkeit des exprimierten Proteins überprüft.

4.4.1 Expressionstest

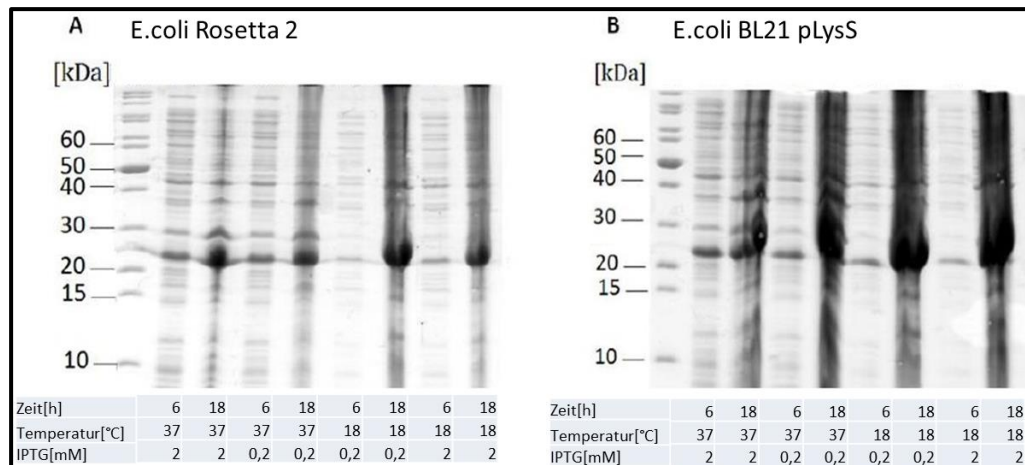


Abbildung 4.11: Test verschiedener Expressionsstämme und -bedingungen: 15%-SDS-Gel, 200 V, 75 min; Marker in kDa; die Mutante ADAM17 Prodomäne zeigt sich als Bande bei etwa 20 kDa. Es wurden für die Expressionsstämme *E. coli* Rosetta 2 und *E. coli* BL21 pLysS sämtliche Kombinationen der Expressionsbedingungen Expressionszeit (6 h bzw. 18 h), Expressionstemperatur (18°C bzw. 37°C) und IPTG-Konzentration (0,2 mM bzw. 2 mM) getestet.

Im Expressionstest in *E. coli* Rosetta 2 und *E. coli* BL21 pLysS wurden sämtliche Kombinationen folgender Bedingungen getestet: Eine Expressionszeit von 6 und 18 Stunden, eine Inkubationstemperatur von 37°C und 18°C und eine die Expression induzierende Zugabe von 2 und 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid. Die höchste Ausbeute an der Mutanten ADAM17 Prodomäne wurde, wie in **Abbildung 4.11** zu erkennen ist, in *E. coli* BL21 pLysS nach 18 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 18°C und nach einer Zugabe von 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid erzielt.

4.4.2 Löslichkeit

Nach einer weiteren Testexpression bei den im Expressionstest ermittelten besten Expressionsbedingungen und dem Aufschluss der Bakterien wurden sowohl der Zellüberstand als auch das Pellet im *SDS-Gel* analysiert, um zu ermitteln, in welcher Form das Protein hauptsächlich vorliegt.

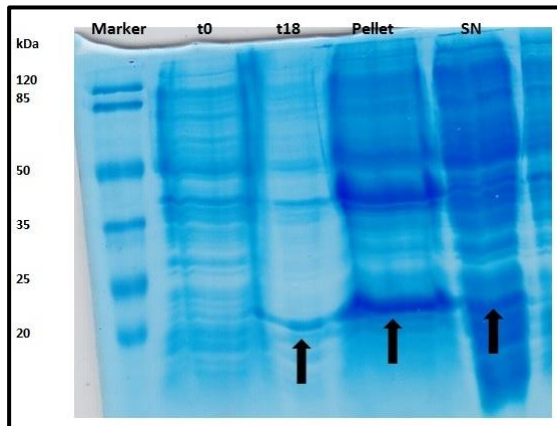


Abbildung 4.12: Löslichkeit des exprimierten Proteins: 15%-SDS-Gel, 200 V, 75 min; Marker in kDa; gezeigt sind Bakteriensuspension zum Expressionszeitpunkt t_0 und t_{18} und Überstand (SN = Supernatant) bzw. resuspendiertes Pellet nach Aufschluss.

Im SDS-Gel nach der Expression, welches in **Abbildung 4.12** dargestellt ist, konnte eine gute Expression nach 18 Stunden (wie auch schon im Expressionstest) gezeigt werden. Außerdem wurde nach Auftragen des in Lämmli-Puffer aufgekochten Pellets eine sehr deutliche Bande bei etwa 20 kDa gesehen, was darauf schließen lässt, dass der Großteil des exprimierten Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne in Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) vorliegt. Allerdings ist auch beim aufgetragenen Überstand (zuvor ebenfalls in Lämmli-Puffer aufgekocht) eine deutliche Bande bei etwa 20 kDa zu sehen. Dies weist darauf hin, dass sich ein Teil des exprimierten Proteins in löslicher Form im Überstand befindet.

4.5 Proteinreinigung

Zur Proteinreinigung wurden mehrere Reinigungsschritte nacheinander durchgeführt.

4.5.1 Affinitätschromatographie

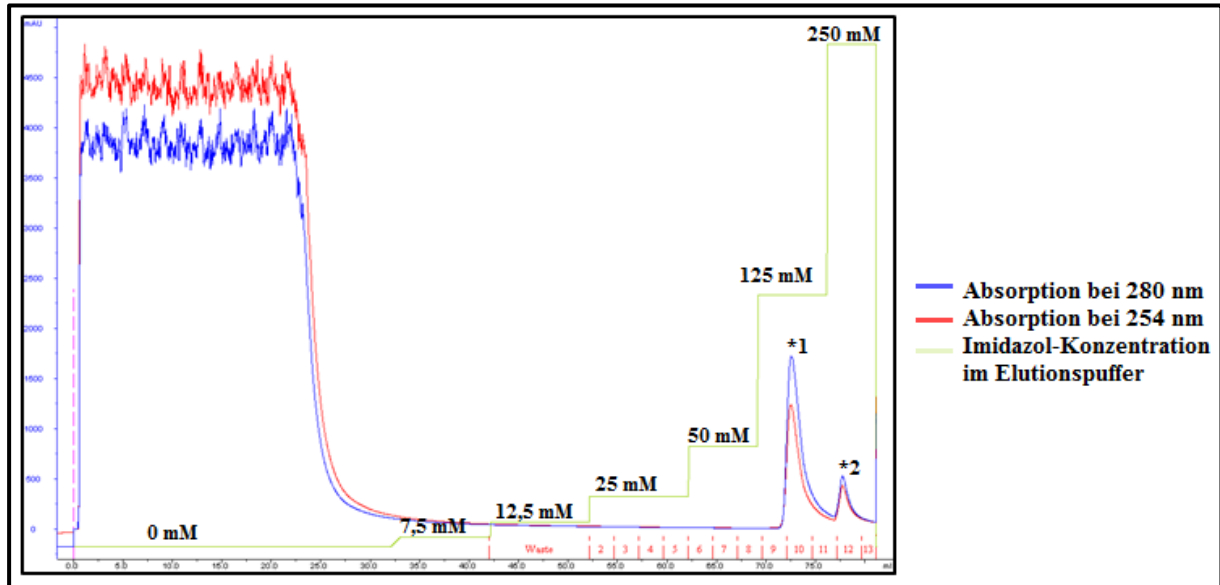


Abbildung 4.13: Affinitätschromatographie: HisTrap FF Crude Säule, Resuspensionspuffer Puffer 1 und Elutionspuffer Puffer 2; Absorption gemessen bei 280 nm (blau) bzw. 254 nm (rot), Imidazol-Anteil des Elutions-Puffers(grün) quantitativ erfasst. Bei einem Imidazol-Anstieg auf 125 mM bzw. 250 mM ist jeweils ein scharfer Peak (gekennzeichnet mit *1 und *2) zu beobachten (Zu Beginn – bei einer Imidazolkonzentration von 0 mM – wird die Kurve durch ein unspezifisches Signal bestimmt).

Nach dem Aufschluss der Bakterien mittels Sonifizierung, Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile und sterilen Filtration der Überstände wurde das gewünschte Protein Mutante ADAM17 Prodomäne aus dem Überstand mittels Affinitätschromatographie, welche in **Abbildung 4.13** dargestellt ist, isoliert. Bei einer Erhöhung des Imidazol-Anteils im Elutionspuffer von 50 mM auf 125 mM bzw. von 125 mM auf 250 mM lässt sich jeweils ein scharfer Peak (welche „Histrap-Fraktion 1“ und „Histrap-Fraktion 2“ entsprechen und mit *1 bzw. *2 gekennzeichnet sind) beobachten. Die beiden Fraktionen wurden jeweils per *SDS*-Gel analysiert, wo eine deutliche Bande bei etwa 20 kDa zu erkennen ist (**Abbildung 4.16**).

4.5.2 Größenausschlusschromatographie

Zur Größenausschlusschromatographie musste zunächst eine Eichkurve der verwendeten Säule erstellt werden. Erst danach konnte der nächste Reinigungsschritt vollzogen werden.

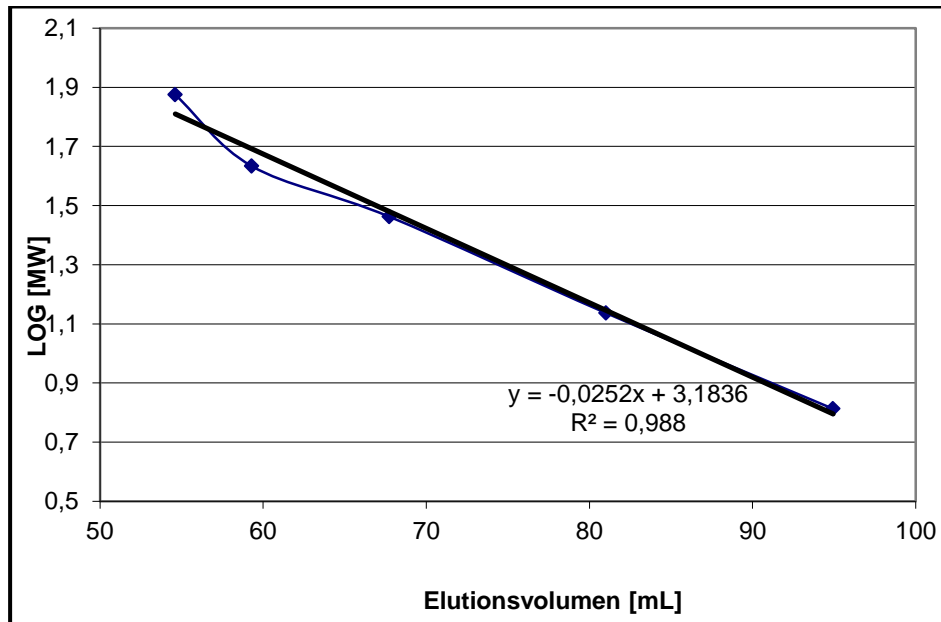


Abbildung 4.14: Eichkurve der HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule: Nach Kalibrierung mit Proteinen bekannter Größe wurde eine Eichkurve für den Zusammenhang zwischen Gewicht des zu eluierenden Proteins und Elutionsvolumen erstellt.

Vor der Größenausschlusschromatographie wurde die *HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade* Säule mit verschiedenen Proteinen bekannten Gewichts kalibriert, um ein abschätzbares Elutionsvolumen für die Mutante ADAM17 Prodomäne vorhersagen zu können. Nach Kalibrierung und Auftragen der Werte für den Logarithmus der Proteinmasse über dem Elutionsvolumen (**Abbildung 4.14**) errechnet sich folgende Funktion, die eine Ausgleichsgerade der erhobenen Daten bestmöglich beschreibt: $f(x) = -0,0252 \cdot x + 3,1836$ (wobei x das Elutionsvolumen in mL und $f(x)$ den Logarithmus des Molekulargewichts darstellt).

Bildet man nun den Logarithmus der Masse der Mutante ADAM17 Prodomäne ($\text{Log}(19,515) = 1,29$) und setzt diesen in die Formel ein ($1,29 = -0,0252 \cdot x + 3,1836$), erhält man ein zu erwartendes Elutionsvolumen für die Mutante ADAM17 Prodomäne von 75,14mL.

Danach wurde mit der kalibrierten Säule der nächste Reinigungsschritt, die Größenausschlusschromatographie, durchgeführt.

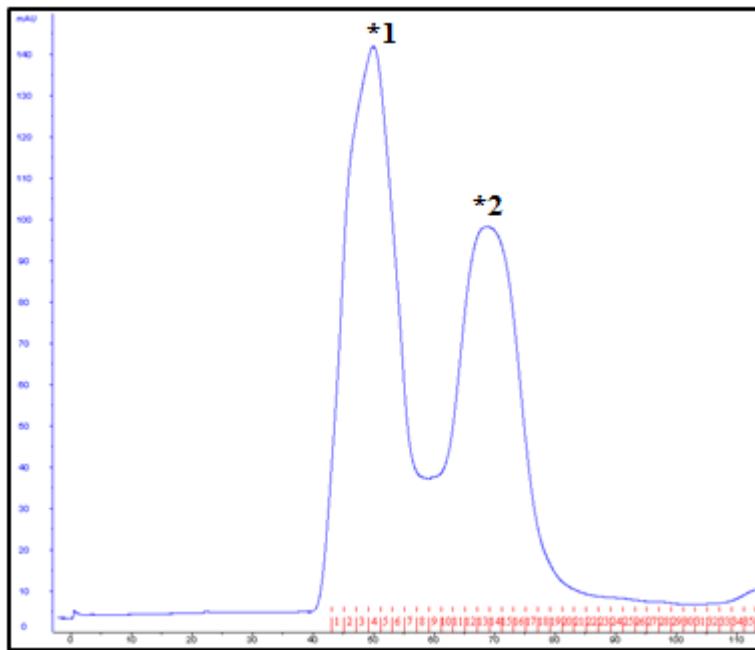


Abbildung 4.15: Größenausschlusschromatographie: HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule, Resuspensions- und Elutionspuffer Puffer 3; Absorption gemessen bei 280 nm. Insgesamt sind 2 Peaks zu erkennen (mit *1 und *2 gekennzeichnet). Dabei entspricht das Volumen des zweiten Peaks (etwa 71 mL) dem errechneten Elutionsvolumen.

Betrachtet man unter Berücksichtigung des zu erwartenden Elutionsvolumens den Lauf der Größenausschlusschromatographie, welcher in **Abbildung 4.15** gezeigt ist, lässt sich leicht erkennen, dass es sich bei dem zweiten Peak um das zu isolierende Protein Mutante ADAM17 Prodomäne handeln sollte. Im Graph ist zu erkennen, dass der zweite Hochpunkt etwa bei 71 mL liegt und damit ungefähr dem vorausgesagten Elutionsvolumen entspricht. Die gesammelten Fraktionen 11 bis 17 zeigen im SDS-Gel (als „Superdex-Fraktion 1“ bezeichnet) ebenso wie die vorher aufgenommenen Fraktionen der Affinitätschromatographie („HisTrap-Fraktion 1 bzw. 2“) eine deutliche Bande bei etwa 20 kDa (**Abbildung 4.16**). Die Fraktion, die nach der Größenausschlusschromatographie isoliert wurde, scheint auf der einen Seite weniger Zielprotein Mutante ADAM17 Prodomäne zu enthalten, auf der anderen Seite weniger Verunreinigungen durch andere Proteine (in Form von zusätzlichen Banden sichtbar).

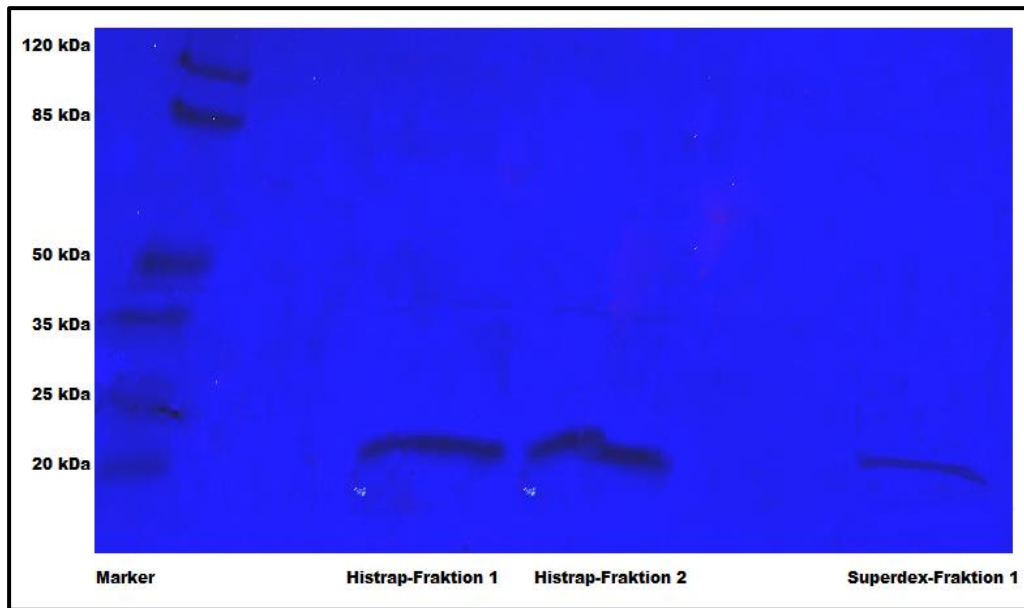


Abbildung 4.16: Gelelektrophorese der gereinigten Proteinfractionen: 15%-SDS-Gel, 200 V, 75 min, Lämmli-Probenpuffer (5x, reduzierend), Marker in kDa; gezeigt sind die Fraktionen nach den verschiedenen Reinigungsschritten. Alle Fraktionen besitzen bei etwa 20 kDa eine Bande, die bei den Histrap-Fractionen deutlicher ausgeprägt ist; dafür besitzt die Superdex-Fraktion weniger Verunreinigungen.

4.5.3 Reduktion der Disulfidbrücken

Wie in **Abbildung 4.3** zu erkennen ist, besitzt die Mutante ADAM17 Prodomäne an 166. Stelle einen Cystein-Rest.

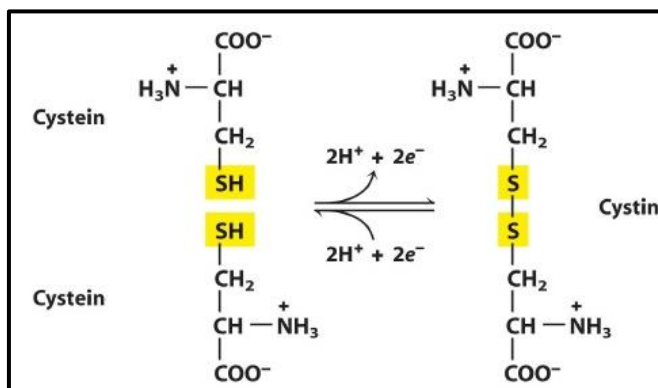


Abbildung 4.17: Disulfidbrückenbildung: Reaktionsgleichung zur Entstehung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein-Resten zweier Proteine.

Cystein-Reste sind in der Lage, untereinander eine kovalente Bindung oder sogenannte Disulfidbrücke einzugehen, was in **Abbildung 4.17** veranschaulicht ist. Diese Bindung kann sowohl in einem einzelnen Protein als auch zwischen zwei Proteinen vorliegen.

Dies kann im Fall der Mutante ADAM17 Prodomäne dazu führen, dass sich zwei Moleküle über eine Disulfidbrücke zwischen dem jeweiligen Cystein-Rest an 167. Stelle kovalent zu einem disulfidverbrückten Dimer verbinden.

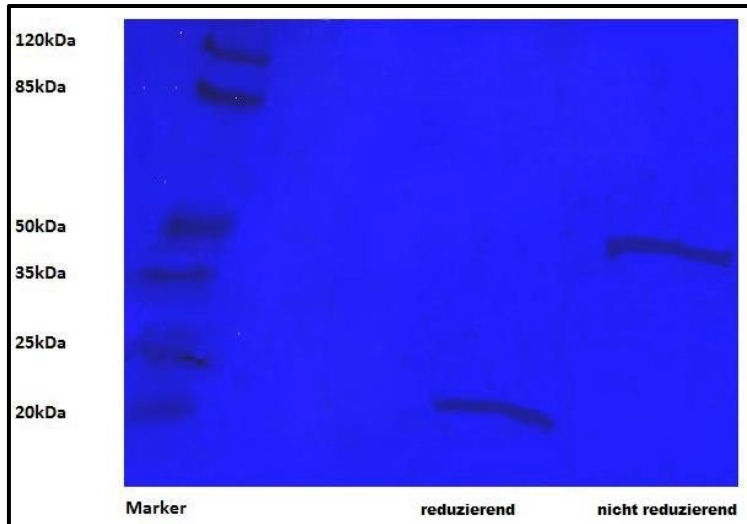


Abbildung 4.18: Dimerisierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen: 15%-SDS-Gel, 200 V, 75 min, Lämmli-Probenpuffer (5x, reduzierend), Lämmli-Probenpuffer (5x, nicht-reduzierend); Marker in kDa; aufgetragen ist jeweils eine Probe der Superdex-Fraktion 1 unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen.

Je eine Probe der Superdex-Fraktion 1 wurde unter reduzierenden (aufgekocht mit Lämmli-Probenpuffer, 5x, reduzierend) und unter nicht-reduzierenden Bedingungen (aufgekocht mit Lämmli-Probenpuffer, 5x, nicht-reduzierend) per SDS-PAGE (**Abbildung 4.18**) analysiert. In beiden Fällen ist eine deutliche Bande zu sehen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen zwischen 35 kDa und 50 kDa, unter reduzierenden Bedingungen bei etwa 20 kDa. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutante ADAM17 Prodomäne tatsächlich unter nicht-reduzierenden Bedingungen als disulfidverbrücktes Dimer vorliegt.

Um eine Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen einzelnen Molekülen der Mutante ADAM17 Prodomäne zu verhindern, wurden die aus der Größenausschlusschromatographie isolierten Fraktionen jeweils mit Dithiothreitol (DTT) bzw. Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt. Sowohl DTT als auch TCEP dienen als Reduktionsmittel und führen dazu, dass eine Dimerisierung verhindert wird und somit die Mutante ADAM17 Prodomäne als Monomer vorliegt. Die reduzierende Wirkung von DTT und TCEP ist in **Abbildung 4.19** bzw. **Abbildung 4.20** verdeutlicht.

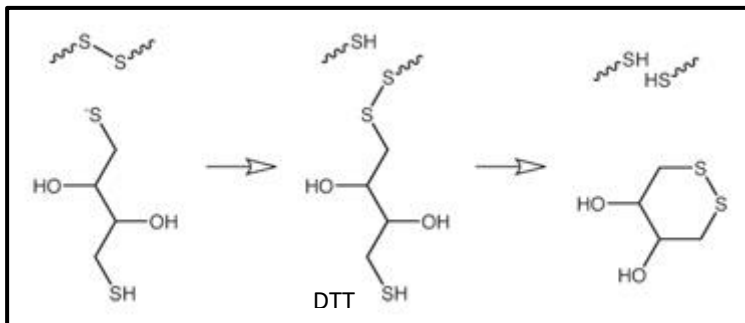


Abbildung 4.19: Reduktion mit DTT: Reaktionsgleichung zur reduzierenden Wirkung von Dithiothreitol (DTT) und Verhinderung der Ausbildung von Disulfidbrücken.

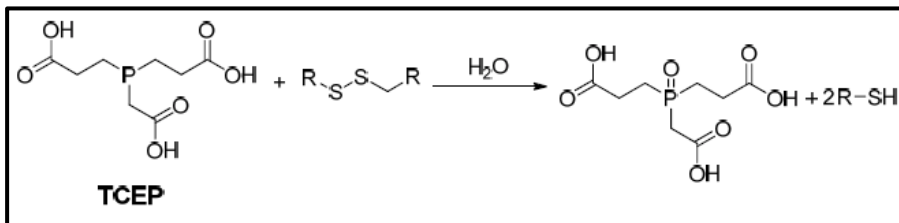


Abbildung 4.20: Reduktion mit TCEP: Reaktionsgleichung zur reduzierenden Wirkung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und Verhinderung der Ausbildung von Disulfidbrücken.

4.5.4 Konzentrierung der Proteinlösung

Nach der Affinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie wurde die isolierte Fraktion („Superdex-Fraktion 1“) mit Hilfe einer Utra-Zentrifugen-Filterereinheit konzentriert. Die ursprüngliche Konzentration von etwa $40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ konnte somit auf $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ erhöht werden.

4.6 Strukturelle Untersuchungen

Mit der Mutante ADAM17 Prodomäne konnten nach Reinigung und Konzentration strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. Unter anderem konnten ein UV-Spektrum, ein Zirkulardichroismus-Spektrum und eine Schmelzkurve aufgenommen werden sowie eine Massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden.

4.6.1 UV-Spektrum

Ein UV-Spektrum der Proteinlösung wurde aufgenommen, um die Endkonzentration der Proteinlösung näherungsweise zu bestimmen. Proteine in Lösung besitzen Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 280 nm, was hauptsächlich an der Absorption der aromatischen Aminosäurereste liegt, und 205 nm, was hauptsächlich durch die Absorption der Peptidbindungen hervorgerufen wird. Gleichzeitig kann so versucht werden, eine Verunreinigung der Proteinlösung durch beispielsweise Nukleinsäuren, welche ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen, oder ähnliches, auszuschließen.

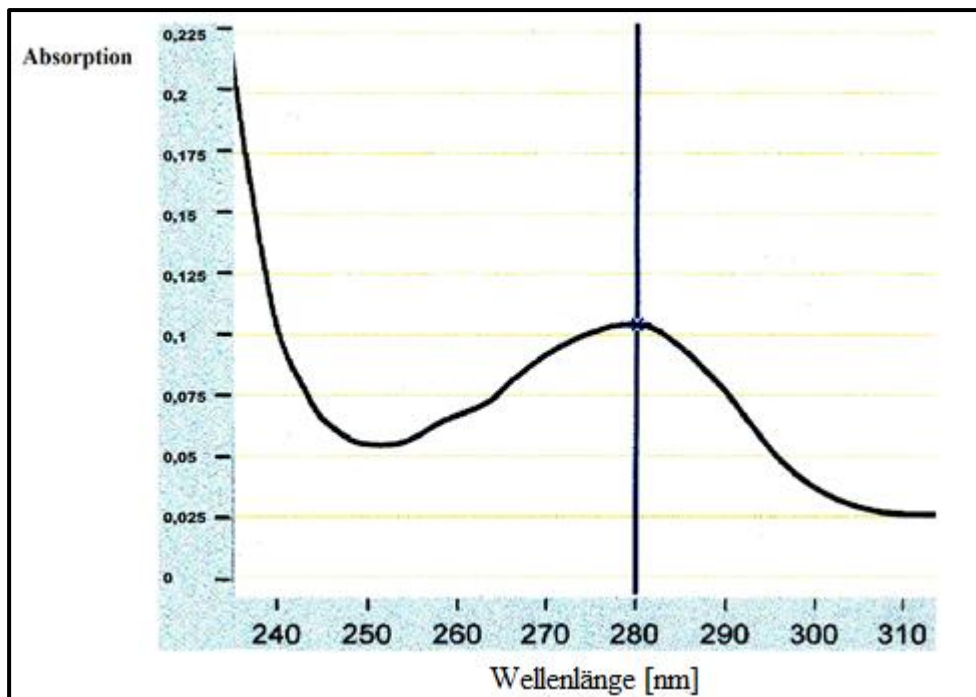


Abbildung 4.21: UV-Spektrum Proteinlösung: Messung der Absorption in Abhängigkeit zur Wellenlänge; bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm ist ein lokales Maximum zu beobachten. Das Lambert-Beer'schen Gesetz ermöglicht die Berechnung der Konzentration der Proteinlösung.

Im aufgenommenen UV-Spektrum, welches in **Abbildung 4.21** gezeigt ist, kann sehr gut ein Absorptionsmaximum bei 280 nm beobachtet werden. Mittels des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes konnte die Konzentration des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne berechnet werden. Bei einer gemessenen Extinktion $E_\lambda = 0,1$, einer Schichtdicke $d = 1$ cm und einem spezifischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{280} = 0,9767 \left[\frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}} \right]$ ergibt sich eine Konzentration von $c = \frac{E_\lambda}{\varepsilon_\lambda \times d} = \frac{0,1}{0,9767 \times 1} \approx 0,102 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 102 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

4.6.2 Massenspektrometrische Analyse

In der massenspektrometrischen Analyse konnte die Mutante ADAM17 Prodomäne als vorwiegend vorliegendes Protein in der analysierten Probe identifiziert werden. Die *Coverage* der ADAM17 Prodomäne betrug 78,1 %. Außerdem konnte die eingebrachte Mutation ($R^{40}A$) dargestellt werden. Die Ergebnisse sind im Bericht des Instituts für experimentelle Medizin im Anhang (Kapitel **6.9 Bericht Massenspektrometrische Analyse**) zu finden.

4.6.3 Zirkulardichroismus-Spektrum

Um den Gehalt an Sekundärstrukturelementen und Schleifenbereichen in der Mutanten ADAM17 Prodomäne zu analysieren, wurde ein Zirkulardichroismus-Spektrum aufgenommen.

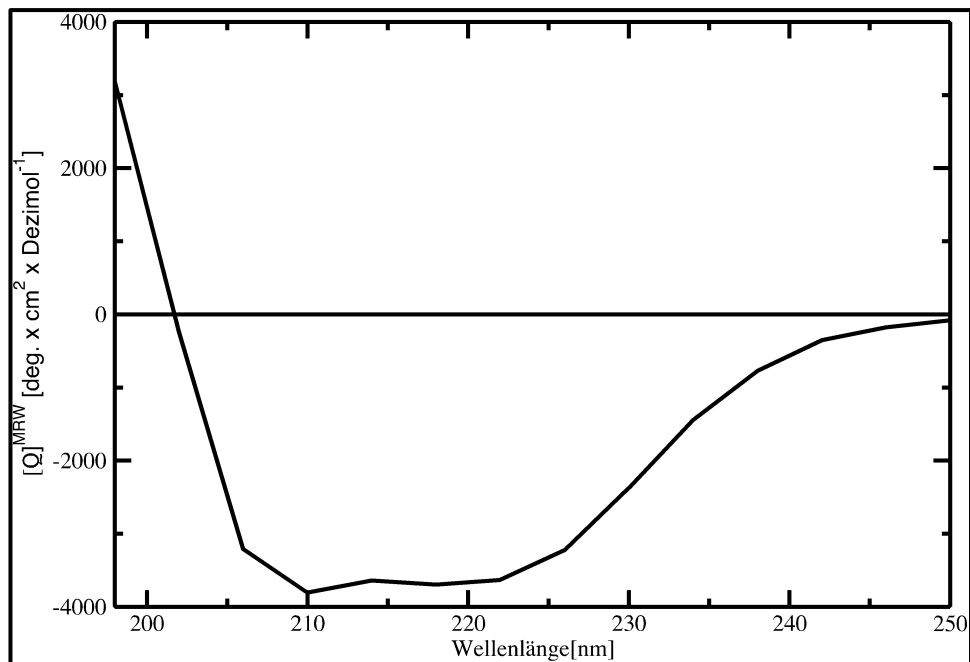


Abbildung 4.22: Zirkulardichroismus-Spektrum: Proteinlösung ($c=$) in Quarzglasküvette (Schichtdicke 5 mm), spektrale Bandbreite 2 nm; die Elliptizität ist über der Wellenlänge aufgetragen; der Verlauf der Kurve entspricht dem Verlauf eines Proteins, das hauptsächlich alphahelikale Strukturen ausgebildet hat.

Im Zirkulardichroismus-Spektrum aus **Abbildung 4.22** ist zu sehen, dass die Kurve der molaren Elliptizität der Mutante ADAM 17 Prodomäne Charakteristika eines Proteins mit höherem Alpha-Helix-Anteil zeigt: Je ein Minimum bei einer Wellenlänge von etwa 208 nm beziehungsweise 220 nm.

4.6.4 Thermostabilität

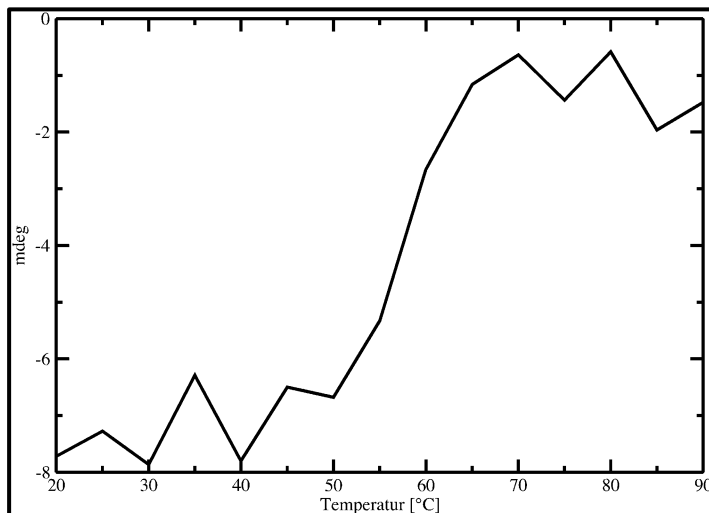


Abbildung 4.23: Schmelzkurve: CD-Spektrum in Abhängigkeit zur Temperatur: Temperaturerhöhung um 1 °C/min von 20 °C auf 95 °C, $\lambda = 222$ nm, $d = 1$ mm; die Schmelzkurve beschreibt einen typisch sigmoidalen Verlauf.

Zur Überprüfung der Tertiärstruktur der Mutanten ADAM17 Prodomäne wurde eine Schmelzkurve des Proteins, welche Aussagen über die Faltung des Proteins zulässt und in **Abbildung 4.23** dargestellt ist, aufgenommen. Die Schmelzkurve, bei der der Zirkulardichroismus in Abhängigkeit zur Temperatur gemessen wird, beschreibt in diesem Fall einen typisch sigmoidalen Verlauf. Ab einer Temperatur von etwa 50°C beginnt die thermische Denaturierung des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne, der Wert des Zirkulardichroismus beginnt stark zu steigen. Bei einer Temperatur von etwa 65°C steigt der Wert nicht mehr und erreicht ein Plateau, das Protein liegt nun vollständig denaturiert vor. Der stringente sigmoidale Verlauf der Schmelzkurve gestattet die Aussage, dass es sich bei dem vorliegenden Protein um ein korrekt gefaltetes, verhältnismäßig reines Monomer handelt.

4.7 Weitere Untersuchungen

Nach der gelungenen Expression, Reinigung, Konzentration und ersten strukturellen Untersuchung des Proteins stehen die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und nachfolgend ein besseres Verständnis der Funktionsweise der Mutante ADAM17 Prodomäne im Vordergrund. Hierzu ist vor allem die Kernspinresonanzspektroskopie (oder NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*)) eine hilfreiche Methode.

4.7.1 Grundprinzip und Voraussetzungen zur NMR-Spektroskopie

Wenn Atomkerne, die einen Eigendrehimpuls besitzen, sich zeitgleich in je einem statischen und einem oszillierenden Magnetfeld befinden, entwickelt sich die kernmagnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance*). Hierbei kommt es bei bestimmten Parametereinstellungen dazu, dass die Kerne die Ausrichtung ihres Spins ändern. Dieser Vorgang wird bei der NMR-Spektroskopie gemessen. Bei der Analyse von Proteinstrukturen werden NMR-Messungen polydimensional vorgenommen und daraufhin können sogenannte Kreuzsignale untersucht werden. Anhand der Analyse dieser Kreuzsignale lässt die NMR-Spektroskopie Aussagen über die Atomzusammensetzung, bestehende kovalente Bindungen und die und dreidimensionale Anordnung der Atome zu. Für die erfolgreiche Analyse mittels NMR-Spektroskopie muss die Probe mehrere essentielle Voraussetzungen erfüllen: Die zu analysierende Protein-Probe muss eine ausreichend hohe Konzentration besitzen, über einen möglichst hohen Reinheits-Grad verfügen und eine hohe Stabilität über einen längeren Zeitraum aufweisen.

4.7.2 Stabilität der Mutante ADAM17 Prodomäne

Während es möglich war, das Protein Mutante ADAM17 Prodomäne hinlänglich zu reinigen und eine ausreichend hohe Konzentration zu erreichen, gelang es nicht, das Protein über einen längeren Zeitraum stabil in Lösung zu halten.

4.7.3 Lösungsansätze

Zur Erhöhung der Stabilität des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne in Lösung wurden verschiedene Lösungsansätze gewählt. Gleichzeitig sollten hohe Reinheit und ausreichend hohe Konzentration natürlich gewahrt bleiben. Daher wurde mit der Proteinlösung zwischen der Affinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie eine Dialyse durchgeführt. Nach der Größenausschlusschromatographie wurde ein Pufferaustausch mittels NAP-5-Säulen versucht. Schließlich wurde nach der Größenausschlusschromatographie eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie vorgenommen.

4.7.3.1 Dialyse

Der Zwischenschritt einer Dialyse zwischen der Affinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie und die damit verbundene Eliminierung von Imidazol aus der Proteinlösung trug nicht zu einer erhöhten Stabilität bzw. Stabilisierung des Proteins Mutante ADAM17 Prodomäne bei.

4.7.3.2 Pufferaustausch der Proteinlösungen

Der Versuch, einen Pufferaustausch der Proteinlösung mittels *NAP* Säulen durchzuführen, um die Stabilität zu erhöhen, ging in allen Fällen mit einem fast kompletten Verlust des Proteins einher.

4.7.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

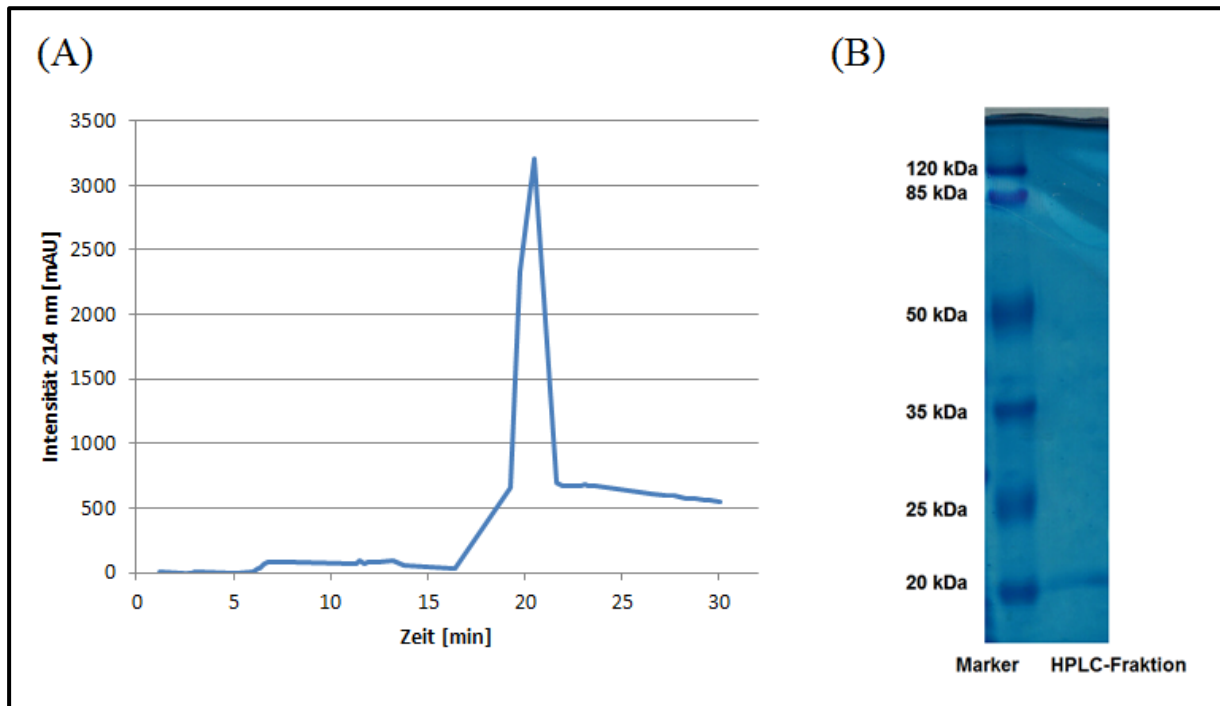


Abbildung 4.24: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie: (A) Laufmittel H₂O/ 0,1 % TFA und Acetonitril/ 0,1 % TFA, Flussrate 1 mL/min, Gradient Acetonitril + 0,6 Prozentpunkte/min. Die Elution der mutanten ADAM17 Prodomäne erfolgte bei etwa 20 min, was einem Acetonitril-Anteil von etwa 29 % entspricht. (B) 15%-SDS-Gel, 200 V, 75 min, Lämmli-Probenpuffer (5x, reduzierend), Marker in kDa; aufgetragen eine Probe der HPLC-Fraktion bei 20 min Elutionszeit, es zeigt sich eine Bande bei 20 kDa.

In **Abbildung 4.24 (A)** erkennt man, dass bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie die Mutante ADAM17 Prodomäne mit einem hohen Peak bei etwa 20 min Elutionszeit (dies entspricht den gesammelten Röhrchen 8-11) gibt. **Abbildung 4.24 (B)** zeigt ein SDS-Gel der HPLC-Fraktion. Bei 20 kDa ist eine deutliche Bande zu erkennen, die der Mutanten ADAM17 Prodomäne entspricht. Sonst zeigen sich keine Verunreinigungen in Form weiterer Banden.

Trotz eines weiteren Reinigungsschrittes durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Acetonitril als Lösungsmittel konnte die Mutante ADAM17 Prodomäne auch hier nicht über einen längeren Zeitraum stabil gehalten werden.

4.8 Enzym-Aktivitäts-Assay

In einem Enzym-Aktivitäts-Assay wurde die Mutante ADAM17 Prodomäne dahingehend untersucht, ob und in welchem Maße sie eine inhibitorische Wirkung auf ADAM17 besitzt. Der Enzym-Aktivitäts-Assay wurde direkt im Anschluss an den vollendeten Reinigungsprozess durchgeführt, sodass die über einen längeren Zeitraum geringe Stabilität nicht ins Gewicht fällt.

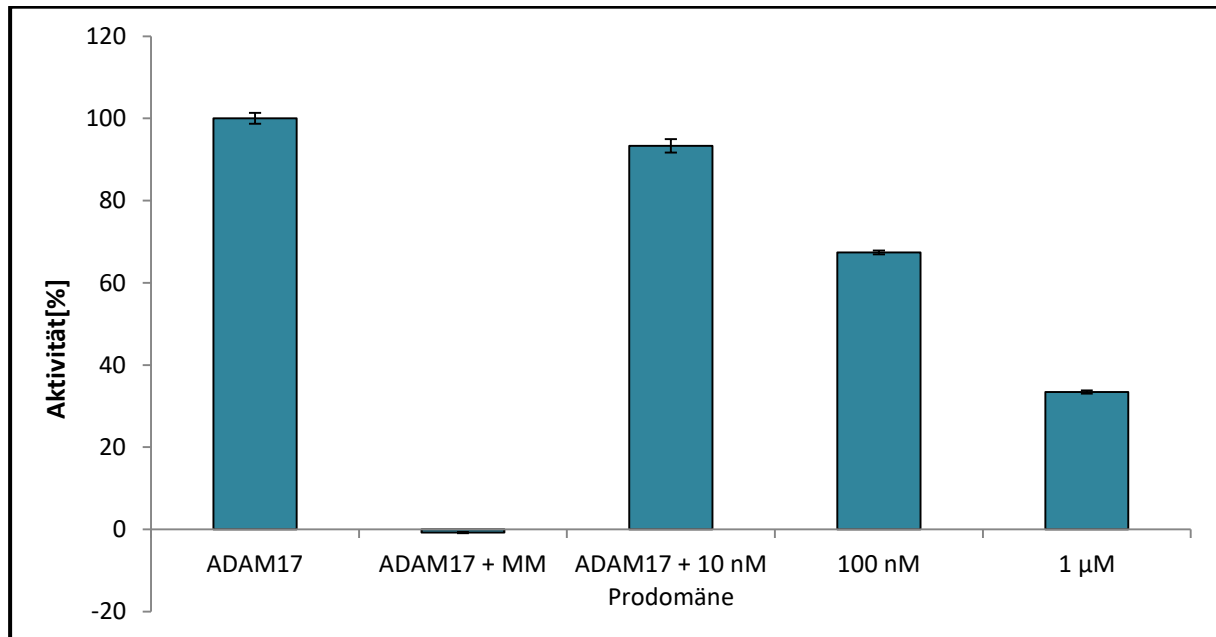


Abbildung 4.25: Enzym-Aktivitäts-Assay von ADAM17: Alle Ansätze enthalten rekombinantes humanes ADAM17 (1,92 nM), ADAM17-Aktivitätspuffer und Fluorogenic Peptide Substrate III (10 µM). Eine Kontrolle wurde ohne Inhibitor durchgeführt („ADAM17“), eine weitere mit Marimastat („ADAM17 + MM“). Die restlichen Ansätze enthalten verschiedene Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 1 µM) Mutante ADAM17 Prodomäne.

Die Ergebnisse des Enzym-Aktivitäts-Assays sind in **Abbildung 4.25** dargestellt. Der Enzym-Aktivitäts-Assay zeigt, dass die Mutante ADAM17 Prodomäne mit steigender Konzentration die Aktivität von ADAM17 zunehmend verringert. Bei einer Konzentration von 10 nmol/L Prodomäne ist zwar noch keine signifikante Hemmung zu erkennen (6,66%), bei einer Konzentration von 100 nmol/L bzw. 1 µmol/L jedoch eine Hemmung der Aktivität von ADAM17 um 32,62% bzw. 66,57%. Die beiden eingeführten Kontrollen waren jeweils erfolgreich: Der Ansatz mit ADAM17 und Substrat zeigt eine hohe Aktivität von ADAM17, bei Zugabe von *Marimastat* wird eine vollständige Blockade der Aktivität von ADAM17 erreicht. Die errechnete mittlere inhibitorische Konzentration der Mutante ADAM17 Prodomäne liegt bei $IC_{50} = 70 \text{ nM}$.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte für die Mutante Form der ADAM17 Prodomäne ein adäquates Expressionssystem und ein geeigneter Reinigungsvorgang etabliert werden. Darüber hinaus konnten zahlreiche Untersuchungen sowohl zum strukturellen Aufbau als auch zur Funktion des Proteins durchgeführt werden.

ADAM17 besitzt aufgrund des großen Substratspektrums eine große Bedeutung in vielfältigen physiologischen Prozessen wie Immunantwort, Wachstums- und Homöostaseprozessen und Zell-Zell/Zell-Matrix-Interaktionen. Konsekutiv folgt daraus eine ebenso kritische Funktion bei pathophysiologischen Vorgängen wie Karzinogenese oder chronischen Entzündungen.

Multidomänenstruktur, Trafficking und Funktionen der übrigen Domänen von ADAM17 sind bisher vergleichsweise ausführlich untersucht, beschrieben und folglich zumindest grundlegend verstanden. Dies gilt bislang nur eingeschränkt für die Prodomäne von ADAM17.

Zur Untersuchung und Analyse der ADAM17 Prodomäne wurde eine Mutante Form verwendet. Diese sollte durch die Mutation, welche in der Aminosäuresequenz an Position 40 ein Arginin durch ein Alanin ersetzt, im Reifungsprozess der Spaltung von Furin entgehen. Ferner besitzt die Mutante ADAM17 Prodomäne ein Hexahistidin-Tag für einen essentiellen Reinigungsschritt, die Affinitätschromatographie.

Der für die mutante Form kodierende DNA-Abschnitt wurde aus dem bestellten Plasmid nach einem Restriktionsverdau und einer Gelextraktion erfolgreich in einen Expressionsvektor eingebracht.

Nach Transformation in verschiedene Bakterienstämme wurde ein Expressionstest mit unterschiedlichen Expressionsbedingungen durchgeführt, die besten Expressionsbedingungen gewählt und anschließend die Löslichkeit des exprimierten Proteins überprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, dass zumindest ein Teil des exprimierten Proteins in löslicher Form vorlag.

Im nächsten Schritt wurde erfolgreich eine Reinigungsprozedur etabliert. Nach Aufschluss der Bakterien durch Sonifizierung, Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation und Mikrofiltration des Überstands wurde zunächst wurde eine

Affinitätschromatographie und anschließend eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. In der anschließenden Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen fiel auf, dass die gereinigte Mutante ADAM17 Prodomäne vermutlich als disulfidverbrücktes Dimer vorlag. Nach Reduktion der Disulfidbrücken bestätigte sich dies - die folgende Gelelektrophorese zeigte eine einzelne Bande, welche dem monomeren Protein entspricht. Schließlich wurde die Konzentration des Proteins für die strukturellen Untersuchungen erfolgreich erhöht und mittels UV-Spektrum bestimmt.

In der Analyse durch Massenspektrometrie, Zirkulardichroismus und Untersuchung der Thermostabilität konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein um ein korrekt gefaltetes, sauberes, primär alpha-helikales Monomer handelt.

Lediglich für die NRM-Spektroskopie zur Analyse der detaillierten Struktur reichte die Zeit, die das Protein stabil in Lösung vorlag, nicht aus. Versuche, die Langzeitstabilität und -löslichkeit des Proteins zu gewährleisten – zu denen unter anderem Dialyse, die Nutzung verschiedenster Pufferlösungen und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zählen – führten nicht zur Erhöhung der Stabilität.

Nichtsdestotrotz konnte mit der im etablierten Reinigungsvorgang gewonnenen, reinen und konzentrierten Mutante ADAM17 Prodomäne ihre Funktion und Wirkungsweise auf ADAM17 erfolgreich untersucht werden. In einem Enzym-Aktivitäts-Assay konnte gezeigt werden, dass die Mutante ADAM17 Prodomäne die Aktivität von ADAM17 bereits in geringen Konzentrationen deutlich verringert.

Zusammenfassend konnten ein Expressionssystem und ein Reinigungsprozess für die Mutante ADAM17 Prodomäne etabliert werden und das Protein auf Struktur und Funktion bezüglich ADAM17 untersucht werden. Lediglich die Langzeitstabilität stellt aktuell noch ein Problem für darauf aufbauende Untersuchungen dar.

5.1 Exkurs: ADAM10 Prodomäne

Aus der Familie der ADAMs ist ADAM10 wohl die ADAM17 am engsten verwandte Metalloprotease. Es liegen, neben einigen grundlegenden Unterschieden, deutliche Ähnlichkeiten oder Vergleichbarkeiten in Aufbau, Substratspektrum, Wirkungsweise und der Bedeutung für physiologische und pathophysiologische Prozesse vor. So besitzt auch die Prodomäne von ADAM10 einen vergleichbaren strukturellen Aufbau wie die Prodomäne von ADAM17.

In unserer Arbeitsgruppe wurden analoge Untersuchungen zur ADAM10 Prodomäne, welche der von ADAM17 in ihrem Aufbau ähnelt, durchgeführt und veröffentlicht¹⁰¹. So gelang es, für die ADAM10 Prodomäne ebenfalls ein Expressions- und Reinigungssystem zu etablieren. Außerdem zeigte sich eine deutlich bessere Langzeitstabilität der ADAM10 Prodomäne. Daher konnten zur Zeit der Abfassung dieser Arbeit bereits erste strukturelle Untersuchungen, unter anderem mittels NMR-Spektroskopie, zur ADAM10 Prodomäne durchgeführt werden.

5.2 Fazit und Ausblick

Für die Mutante ADAM17 Prodomäne konnte ein erfolgreiches Expressionssystem und ein adäquater Reinigungsprozess etabliert werden. Verschiedenste strukturelle Untersuchungen wurden durchgeführt. Außerdem konnte eine deutlich inhibierende Wirkung auf ADAM17 bereits in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Lediglich die fehlende Langzeitstabilität steht zurzeit noch weiteren strukturellen und funktionellen Untersuchungen im Wege.

In Zusammenschau mit dem Erfolg dieser Arbeit und der parallel vorliegenden, fortgeschrittenen Arbeit zur Prodomäne von ADAM10 lässt sich vermutlich in Zukunft eine Langzeitstabilität des Proteins herstellen. Dies würde weitere Untersuchungen zur Struktur (z.B. NMR-Spektroskopie) und zur Funktion der ADAM17 Prodomäne nicht nur *in vitro*, sondern darauf basierend schließlich auch *in cellulo* und *in vivo* ermöglichen, welche den Umfang der vorliegenden Arbeit jedoch deutlich überschreiten.

Das in dieser Arbeit erfolgreich etablierte Expressions- und Reinigungsverfahren der Mutante ADAM17 Prodomäne, die hier beschrieben und weitere strukturelle Untersuchungen, die in dieser Arbeit *in vitro* bereits nachgewiesene und – nach Lösung des Langzeitstabilitätsproblems – *in cellulo* und letztlich *in vivo* zu überprüfende inhibierende Wirkung auf ADAM17 könnten, in Anbetracht der Substratvielfalt und der Rolle von ADAM17 in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, in Zukunft sogar Grundlage für eine (prä-)klinische Bedeutung der ADAM17 Prodomäne sein.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Weber, S. & Saftig, P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* **139**, 3693–3709 (2012).
2. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1–6 (1994).
3. Klein, T. & Bischoff, R. Active Metalloproteases of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) Family: Biological Function and Structure. *J. Proteome Res.* **10**, 17–33 (2011).
4. Igarashi, T., Araki, S., Mori, H. & Takeda, S. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett.* **581**, 2416–2422 (2007).
5. Murphy, G. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the ‘Sheddases’. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 138–145 (2009).
6. Seals, D. F. & Courtneidge, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**, 7–30 (2003).
7. Reiss, K. & Saftig, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 126–137 (2009).
8. Black, R. A. & White, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 654–659 (1998).
9. Takeda, S. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 146–152 (2009).

10. Schlondorff, J. & Blobel, C. P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* **112**, 3603–3617 (1999).
11. Müllberg, J., Althoff, K., Jostock, T. & Rose-John, S. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 27–38 (2000).
12. Ehlers, M. R. & Riordan, J. F. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* **30**, 10065–10074 (1991).
13. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29**, 258–289 (2008).
14. Saftig, P. & Reiss, K. The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 527–535 (2011).
15. Gall, S. M. L. *et al.* ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor α , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor α . *Mol. Biol. Cell* **20**, 1785–1794 (2009).
16. Blobel, C. P. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 606–612 (2000).
17. Moss, M. L. & Bartsch, J. W. Therapeutic Benefits from Targeting of ADAM Family Members. *Biochemistry* **43**, 7227–7235 (2004).
18. Sammel, M. *et al.* Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3677 (2019).

19. van der Vorst, E. P. C., Weber, C. & Donners, M. M. P. C. A Disintegrin and Metalloproteases (ADAMs) in Cardiovascular, Metabolic and Inflammatory Diseases: Aspects for Theranostic Approaches. *Thromb. Haemost.* **118**, 1167–1175 (2018).
20. Li, W. *et al.* ADAM17 promotes lymph node metastasis in gastric cancer via activation of the Notch and Wnt signaling pathways. *Int. J. Mol. Med.* **43**, 914–926 (2019).
21. Bolik, J. The role of the metalloprotease ADAM17 in metastasis. (Christian-Albrechts Universität Kiel, 2019).
22. Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C. & Rose-John, S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* **32**, 380–387 (2011).
23. Horiuchi, K. A brief history of tumor necrosis factor α -converting enzyme: an overview of ectodomain shedding. *Keio J. Med.* **62**, 29–36 (2013).
24. Maskos, K. *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 3408–3412 (1998).
25. Caescu, C. I., Jeschke, G. R. & Turk, B. E. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.* **424**, 79–88 (2009).
26. Scharfenberg, F. *et al.* Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* (2019). doi:10.1007/s00018-019-03184-4
27. Peschon, J. J. *et al.* An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* **282**, 1281–1284 (1998).
28. Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. & Arribas, J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J.* **22**, 1114–1124 (2003).

29. Gooz, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 146–169 (2010).
30. Rose-John, S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol. Res.* **71**, 19–22 (2013).
31. 385729a0.pdf. Available at:
<https://www.nature.com/nature/journal/v385/n6618/pdf/385729a0.pdf>. (Accessed: 7th November 2017)
32. Reddy, P. *et al.* Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14608–14614 (2000).
33. Moss, M. L. *et al.* Structural features and biochemical properties of TNF- α converting enzyme (TACE). *J. Neuroimmunol.* **72**, 127–129 (1997).
34. Esselens, J. A. and C. ADAM17 as a Therapeutic Target in Multiple Diseases. *Current Pharmaceutical Design* (2009). Available at: <http://www.eurekaselect.com/69550/article>. (Accessed: 8th November 2017)
35. Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M. & Hammad, H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 745–758 (2018).
36. Pruessmeyer, J. & Ludwig, A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 164–174 (2009).
37. Zunke, F. & Rose-John, S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1864**, 2059–2070 (2017).
38. Düsterhöft, S., Lokau, J. & Garbers, C. The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathol. - Res. Pract.* **215**, 152410 (2019).

39. Blaydon, D. C. *et al.* Inflammatory Skin and Bowel Disease Linked to ADAM17 Deletion. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1502–1508 (2011).
40. Chalaris, A. *et al.* Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J. Exp. Med.* jem.20092366 (2010). doi:10.1084/jem.20092366
41. Franzke, C.-W. *et al.* Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand–dependent terminal keratinocyte differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 1105–1119 (2012).
42. Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**, 769–779 (2004).
43. Bandsma, R. H. J. *et al.* Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Hum. Pathol.* **46**, 923–928 (2015).
44. Chalaris, A. *et al.* ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by γ -secretase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 234–245 (2010).
45. Sharma, M. *et al.* Blockade of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) enhances IL-1 β and IFN- γ via caspase-1 activation: A probable cause for loss of efficacy of TACE inhibitors in humans? *Eur. J. Pharmacol.* **701**, 106–113 (2013).
46. Moss, M. L., Sklair-Tavron, L. & Nudelman, R. Drug Insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 300–309 (2008).
47. Trad, A. *et al.* ADAM17-overexpressing breast cancer cells selectively targeted by antibody–toxin conjugates. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 411–421 (2013).

48. Saad, M. I. *et al.* ADAM17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer. *EMBO Mol. Med.* **11**, (2019).
49. Hartl, D. *et al.* A rare loss-of-function variant of ADAM17 is associated with late-onset familial Alzheimer disease. *Mol. Psychiatry* (2018). doi:10.1038/s41380-018-0091-8
50. Kato, T., Hagiyaama, M. & Ito, A. Renal ADAM10 and 17: Their Physiological and Medical Meanings. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, (2018).
51. de Araujo Silva, T. G. *et al.* ADAM17 Cleaves the Insulin Receptor α -Subunit on Endothelial Cells and Induces Vascular Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *FASEB J.* **33**, 685.7-685.7 (2019).
52. Matthews, V. *et al.* Cellular Cholesterol Depletion Triggers Shedding of the Human Interleukin-6 Receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* **278**, 38829–38839 (2003).
53. Saad, M. I., Rose-John, S. & Jenkins, B. J. ADAM17: An Emerging Therapeutic Target for Lung Cancer. *Cancers* **11**, (2019).
54. Saad, M. I. *et al.* The ADAM17 Protease Promotes Tobacco Smoke Carcinogen-induced Lung Tumourigenesis. *Carcinogenesis* (2019). doi:10.1093/carcin/bgz123
55. Dombernowsky, S. L. *et al.* The sorting protein PACS-2 promotes ErbB signalling by regulating recycling of the metalloproteinase ADAM17. *Nat. Commun.* **6**, ncomms8518 (2015).
56. Moss, M. L. & Minond, D. Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2017**, 9673537 (2017).
57. Malemud, C. J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. *Biochem. Pharmacol.* **165**, 33–40 (2019).

58. Grötzinger, J., Lorenzen, I. & Düsterhöft, S. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1864**, 2088–2095 (2017).
59. Düsterhöft, S., Babendreyer, A., Giese, A. A., Flasshove, C. & Ludwig, A. Status update on iRhom and ADAM17: It's still complicated. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1866**, 1567–1583 (2019).
60. Sommer, A. *et al.* Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat. Commun.* **7**, ncomms11523 (2016).
61. Düsterhöft, S. *et al.* A Disintegrin and Metalloprotease 17 Dynamic Interaction Sequence, the Sweet Tooth for the Human Interleukin 6 Receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 16336–16348 (2014).
62. Schlöndorff, J., Becherer, J. D. & Blobel, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE). *Biochem. J.* **347**, 131–138 (2000).
63. Pavlenko, E. *et al.* Functional Characterization of Colon Cancer-Associated Mutations in ADAM17: Modifications in the Pro-Domain Interfere with Trafficking and Maturation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2198 (2019).
64. Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5578–5582 (1990).
65. Gonzales, P. E. *et al.* Inhibition of the Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme by Its Pro Domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 31638–31645 (2004).

66. Wichert, R. *et al.* Meprin β induces activities of A disintegrin and metalloproteinases 9, 10, and 17 by specific prodomain cleavage. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201801371R (2019). doi:10.1096/fj.201801371R
67. Leonard, J. D., Lin, F. & Milla, M. E. Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem. J.* **387**, 797–805 (2005).
68. Milla, M. E. *et al.* Specific Sequence Elements Are Required for the Expression of Functional Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* **274**, 30563–30570 (1999).
69. Li, X. *et al.* The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 641–651 (2009).
70. Moss, M. L. *et al.* The ADAM10 Prodomain Is a Specific Inhibitor of ADAM10 Proteolytic Activity and Inhibits Cellular Shedding Events. *J. Biol. Chem.* **282**, 35712–35721 (2007).
71. Gall, S. M. L. *et al.* ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci* **123**, 3913–3922 (2010).
72. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
73. Duesterhoeft, S. Die membranproximale Domäne von ADAM17 - Ein Schlüssel zur Regulation der Proteaseaktivität. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU Kiel* (2014).
74. Schubert, K., Collins, L. E., Green, P., Nagase, H. & Troeberg, L. LRP1 Controls TNF Release via the TIMP-3/ADAM17 Axis in Endotoxin-Activated Macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **202**, 1501–1509 (2019).

75. Lee, M.-H. *et al.* Engineering N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 to be a better inhibitor against tumour necrosis factor- α -converting enzyme. *Biochem. J.* **364**, 227–234 (2002).
76. Wisniewska, M. *et al.* Structural Determinants of the ADAM Inhibition by TIMP-3: Crystal Structure of the TACE-N-TIMP-3 Complex. *J. Mol. Biol.* **381**, 1307–1319 (2008).
77. Schäfer, M. *et al.* GRP78 protects a disintegrin and metalloprotease 17 against protein-disulfide isomerase A6 catalyzed inactivation. *FEBS Lett.* n/a-n/a doi:10.1002/1873-3468.12858
78. Düsterhöft, S. *et al.* Membrane-Proximal Domain of a Disintegrin and Metalloprotease-17 Represents the Putative Molecular Switch of Its Shedding Activity Operated by Protein-disulfide Isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5776–5781 (2013).
79. Willems, S. H. *et al.* Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem. J.* **428**, 439–450 (2010).
80. Lorenzen, I., Trad, A. & Grötzinger, J. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 330–336 (2011).
81. Lorenzen, I. *et al.* Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci. Rep.* **6**, srep35067 (2016).
82. Lorenzen, I. *et al.* The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* **586**, 1093–1100 (2012).
83. Düsterhöft, S. *et al.* Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry* **54**, 5791–5801 (2015).

84. Li, X., Pérez, L., Pan, Z. & Fan, H. The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res.* **17**, 985–998 (2007).
85. Doedens, J. R., Mahimkar, R. M. & Black, R. A. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 331–338 (2003).
86. Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M. & Derynck, R. TACE Activation by MAPK-Mediated Regulation of Cell Surface Dimerization and TIMP3 Association. *Sci. Signal.* **5**, ra34 (2012).
87. Cabron, A.-S. *et al.* Structural and Functional Analyses of the Shedding Protease ADAM17 in HoxB8-Immortalized Macrophages and Dendritic-like Cells. *J. Immunol. Author Choice* **201**, 3106–3118 (2018).
88. Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N. & Freeman, M. Tumor Necrosis Factor Signaling Requires iRhom2 to Promote Trafficking and Activation of TACE. *Science* **335**, 225–228 (2012).
89. Maretzky, T. *et al.* iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11433–11438 (2013).
90. Doedens, J. R. & Black, R. A. Stimulation-induced Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14598–14607 (2000).
91. Dang, M. *et al.* Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9776–9781 (2013).
92. Groth, E. *et al.* Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1863**, 2795–2808 (2016).

93. Black, R. A. Tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1–5 (2002).
94. Yoda, M. *et al.* Systemic Overexpression of TNF α -converting Enzyme Does Not Lead to Enhanced Shedding Activity In Vivo. *PLOS ONE* **8**, e54412 (2013).
95. Tellier, E. *et al.* The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3969–3980 (2006).
96. Gutiérrez-López, M. *et al.* The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 3275–92 (2011).
97. Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J. & Garbers, C. Minimal Interleukin 6 (IL-6) Receptor Stalk Composition for IL-6 Receptor Shedding and IL-6 Classic Signaling. *J. Biol. Chem.* **288**, 14756–14768 (2013).
98. Riethmueller, S. *et al.* Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci. Rep.* **6**, srep25550 (2016).
99. Althoff, K. *et al.* Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem. J.* **353**, 663–672 (2001).
100. Gonzales, P. E., Galli, J. D. & Milla, M. E. Identification of Key Sequence Determinants for the Inhibitory Function of the Prodomain of TACE. *Biochemistry* **47**, 9911–9919 (2008).
101. Uhrlaub, F. Rekombinante Expression der ADAM10-Prodomäne. *Bachelorarbeit am Biochemischen Institut der CAU Kiel* (2017).

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
Brij-35	Polyalkylenglykolether
CANDIS	Conserved ADAM-Seventeen Dynamic Interaction Sequence
CD	Zirkulardichroismus
CD44	Cluster of Differentiation 44
Da	Dalton
dd	doppelt destilliert
DH5- α	E. coli-Stamm Douglas Hanahan 5 α
Dpa	N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GRP-78	78 kDa Glucose-Regulated Protein
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like Growth Factor

IL-1RII	Interleukin-1-Rezeptor, Typ II
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
INF- γ	Interferon- γ
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iRhom2	Inaktives Rhomboid-Protein 2
kb	Kilobase
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lysophosphatidsäure
L-Selektin	Lymphozyten-Selektin
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein- Kinase
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPD	Membranproximale Domäne
MW	Molecular Weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD ₆₀₀	Optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm)
PACS-2	Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein 2
PDI	Proteindisulfidisomerase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
rpm	Rounds Per Minute

SDS	Natriumlaurylsulfat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TIMP3	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Nicht aufgeführt in diesem Abkürzungsverzeichnis sind chemische Elemente, physikalische Einheiten, Aminosäuren und Nukleinsäuren. Für sie wurden die allgemein gebräuchlichen Abkürzungen verwendet.

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau von ADAMs.....	2
Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von ADAM17	8
Abbildung 1.3: Verschiedene Zustände von ADAM17 an der Zelloberfläche.....	10
Abbildung 3.1: RP-HPLC-Programm	31
Abbildung 4.1: DNA-Sequenz der Mutante ADAM17 Prodomäne	33
Abbildung 4.2: Wildtyp-DNA-Abschnitt, der für die Prodomäne kodiert	34
Abbildung 4.3: Aminosäuresequenz der Mutante ADAM17 Prodomäne	35
Abbildung 4.4: Wildtyp-Aminosäuresequenz der ADAM17 Prodomäne	35
Abbildung 4.5: Schema des Restriktionsverdau	36
Abbildung 4.6: Restriktionsverdau des Vektors pMA-T	37
Abbildung 4.7: UV-Spektrum der aus Agarosegelen isolierten DNA	38
Abbildung 4.8: Schema der Ligation	38
Abbildung 4.9: Schema des zusätzlichen Kontroll-Restriktionsverdau.....	39
Abbildung 4.10: UV-Spektrum der amplifizierten DNA.....	40
Abbildung 4.11: Test verschiedener Expressionsstämme und -bedingungen.....	41
Abbildung 4.12: Löslichkeit des exprimierten Proteins.....	42
Abbildung 4.13: Affinitätschromatographie	43
Abbildung 4.14: Eichkurve der HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule.....	44
Abbildung 4.15: Größenausschlusschromatographie.....	45
Abbildung 4.16: Gelelektrophorese der gereinigten Proteinfraktionen	46
Abbildung 4.17: Disulfidbrückenbildung	46

Abbildung 4.18: Dimerisierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen	47
Abbildung 4.19: Reduktion mit DTT	48
Abbildung 4.20: Reduktion mit TCEP	48
Abbildung 4.21: UV-Spektrum Proteinlösung	49
Abbildung 4.22: Zirkulardichroismus-Spektrum	51
Abbildung 4.23: Schmelzkurve: CD-Spektrum in Abhängigkeit zur Temperatur.....	52
Abbildung 4.24: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	55
Abbildung 4.25: Enzym-Aktivitäts-Assay von ADAM17	56
Abbildung 6.1: pMA-T-Vektorkarte	78
Abbildung 6.2: DNA-Sequenzierung	79

6.4 Formelverzeichnis

Formel 3.1: Insert	23
Formel 3.2: Volumen	26
Formel 3.3: Lambert-Beer'sches Gesetz	29
Formel 3.4: Eliptizität	29

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Medien	14
Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer	15
Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer (fortgesetzt)	16
Tabelle 3.2: Verwendete angesetzte Puffer (fortgesetzt)	17
Tabelle 3.3: Verwendete kommerzielle Puffer	17
Tabelle 3.4: Verwendete Enzyme	18
Tabelle 3.5: Verwendete Plasmide	18
Tabelle 3.6: Verwendete Primer	19
Tabelle 3.7: Verwendete kommerzielle Marker	19
Tabelle 3.8: Im ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay verwendete Chemikalien	19
Tabelle 3.9: Pipettierschema des Restriktionsverdau	21
Tabelle 3.10: Pipettierschema des Restriktionsverdau	22
Tabelle 3.11: Zusammensetzung Agarosegele	22
Tabelle 3.12: Pipettierschemata der Ligationsansätze für verschiedene molare Verhältnisse von Vektor zu Insert	24
Tabelle 3.13: Zusammensetzung 15%-SDS-Gel	27
Tabelle 3.14: Pipettierschema zum ADAM17-Enzym-Aktivitäts-Assay	32

6.6 Eigenschaften der Mutante ADAM17 Prodomäne

Durchschnittliche Molekülmasse 19514.8633 Da

Extinktionskoeffizient 0,9767 $\left[\frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}\right]$

Geschätzter Isoelektrischer Punkt pI 7,12

Geschätzte Ladung bei pH 7,00 0,6

Geschätzte Ladung in Abhängigkeit des pH-Wertes:

pH	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Ladung	25,5	19,1	13,3	9,7	6,9	3,6	0,6	-1,4	-2,6	-3,7	-5,3	-8,2	-13

6.7 Vektorkarte

Die DNA-Sequenz, die für die Mutante ADAM17 Prodomäne kodiert, wurde im Vektor pMA-T, dessen Vektorkarte in **Abbildung 6.1** beschrieben ist, von Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) hergestellt.

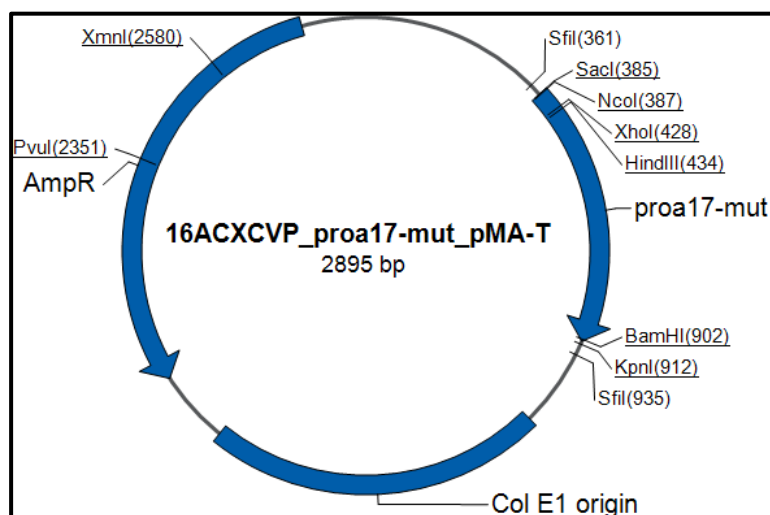


Abbildung 6.1: pMA-T-Vektorkarte: Im Vektor pMA-T wurde der für die Mutante ADAM17 Prodomäne kodierende DANN-Abschnitt verschickt. Er enthält außerdem ein Ampicillin-Resistenz-Gen und Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, u.a. BamHI und NcoI.

6.8 DNA-Sequenzierungsergebnisse

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung sind in **Abbildung 6.2** dargestellt. Sie belegen die erfolgreiche Umklonierung des DNA-Abschnitts in den Expressionsvektor.

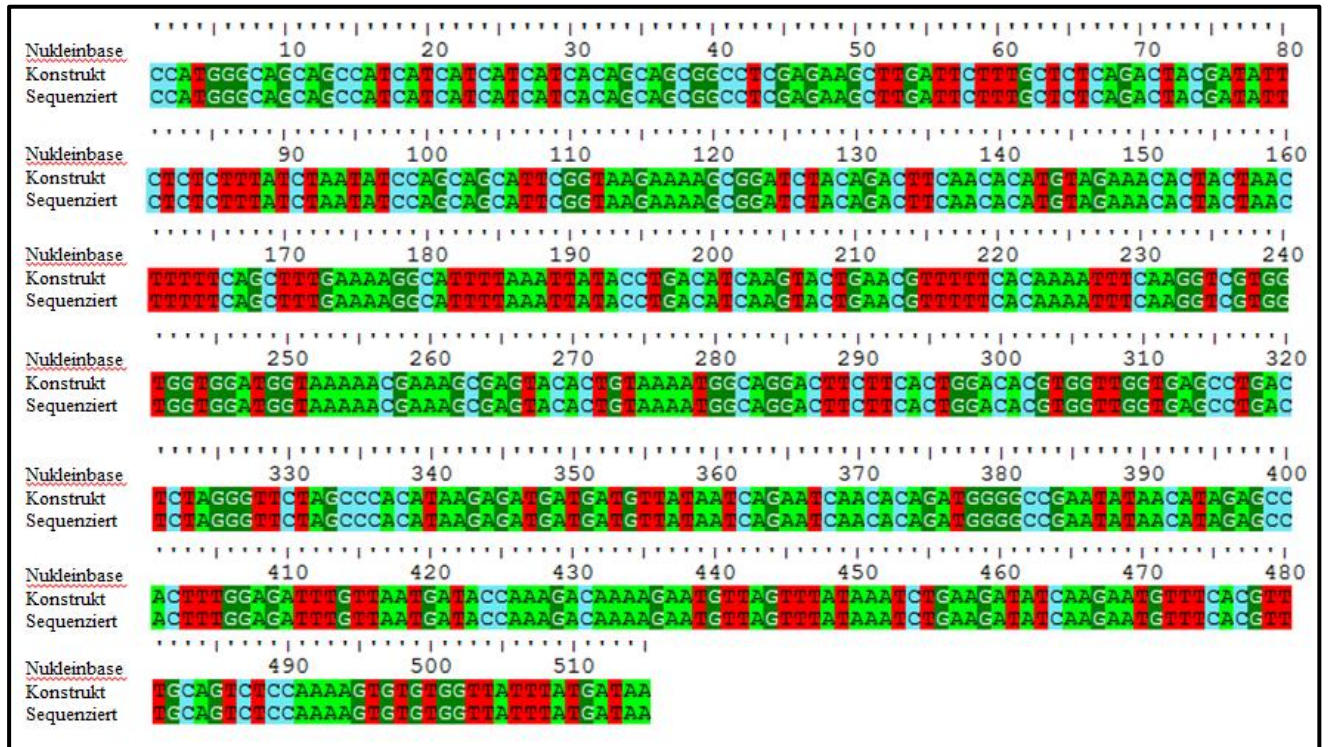


Abbildung 6.2: DNA-Sequenzierung: Konstrukt: Ursprünglicher für die Mutante ADAM17 Prodomäne kodierender DNA-Abschnitt. Sequenziert: Ausschnitt aus dem Sequenzierungsergebnis des hergestellten Expressionsvektors pET28a, der den gleichen DNA-Abschnitt enthält. Die Übereinstimmung von 100% zeigt, dass der DNA-Abschnitt erfolgreich umkloniert wurde.

6.9 Bericht Massenspektrometrische Analyse

Researcher: A. Grötzinger

SFB 877 Project Nr.: A6

Sample set: 2017jun21

1. Aim of the experiment:

The aim of this experiment was to identify the recombinant mutated prodomain of ADAM17.

2. Sample delivery:

The samples were delivered in eppendorf tubes:

sample 1: SEC 1 in P1 (50mM TRIS, 300mM NaCl, 0.1M TCEP, pH=8).

sample 2: SEC 2 in P1 (50mM TRIS, 300mM NaCl, 0.1M TCEP, pH=8)

sample 3: SEC 1 in P2 (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0.1M TCEP, 10mM CaCl₂, 5uM ZnCl₂, pH=8)

sample 4: SEC 2 in P2 (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0.1M TCEP, 10mM CaCl₂, 5uM ZnCl₂, pH=8)

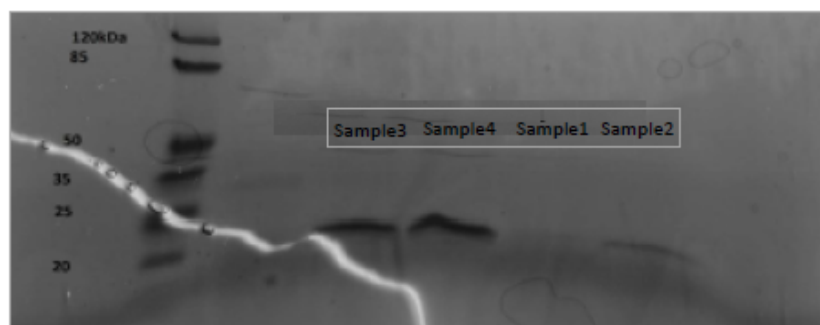


Figure 1. Coomassie gel delivered by T. Hüselbus (AG Grötzinger). Aliquots from the four fractions were loaded into a coomassie gel. SEC 1 and 2 has a mass in kDa of aprox. 20 kDa. sample 1: SEC 1 in P1 (50mM TRIS, 300mM NaCl, 0.1M TCEP, pH=8), sample 2: SEC 2 in P1 (50mM TRIS, 300mM NaCl, 0.1M TCEP, pH=8), sample 3: SEC 1 in P2 (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0.1M TCEP, 10mM CaCl₂, 5uM ZnCl₂, pH=8), sample 4: SEC 2 in P2 (50mM TRIS, 150mM NaCl, 0.1M TCEP, 10mM CaCl₂, 5uM ZnCl₂, pH=8)

3. Sample preparation:

In solution sample preparation were used: the samples were precipitated with acetone at -20°C overnight. The samples were centrifuged at 8.000 x g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the protein pellet was resuspended in 100 mM Ammonium BiCarbonate (ABC) with 6M Urea. Reduction of the disulfide bonds in the protein were performed with 10 mM dithiotreitol (DTT) at 56°C for 1 hour. After reduction, the thiol groups were alkylated using 100 mM Iodoacetamide (IAA) at room temperature for 1 hour

Analysts: D. Yepes & A. Tholey

Date of report 09.08.2017

Page 1 of 4

in the dark. The sample was diluted 3-fold with 100 mM of ABC pH 8 to a final concentration of 2M Urea. The samples were incubated in presence of sequencing grade modified trypsin 1:50 protease:protein ratio at 37°C overnight. The samples were purified using SPE-cartridges (Waters, Sep-Pak C18 1cc 50 mg Sorbent cartridges). The samples were dried in a SpeedVac and then peptides were resuspended in running buffer (3%ACN, 0.05% TFA).

4. LC/MS measurements

In-gel digested in vitro samples were analyzed on a Dionex Ultimate 3000 nano-HPLC coupled to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen). The samples were washed on a trap column (Acclaim Pepmap 100 C18, 10 mm × 300 µm, 3 µm, 100 Å, Dionex) for 5 min with 3% ACN/0.1% TFA at a flow rate of 30 µl/min prior to peptide separation using an Acclaim PepMap 100 C18 analytical column (15 cm × 75 µm, 3 µm, 100 Å, Dionex). A flow rate of 300 nL/min using eluent A (0.05% FA) and eluent B (80% ACN/0.04% FA) was used for gradient separation as follows: linear gradient 5%±50% B in 120 min, 50%±95% B in 5 min, 95% B for 10 min, 95%±5% B in 0.1 min, and equilibration at 5% B for 10 min. Spray voltage applied on a metal-coated PicoTip emitter (30 µm tip size, New Objective, Woburn, Massachusetts, US) was 1.25 kV, with a source temperature of 250°C. Full scan MS spectra were acquired from 5 to 145 min between 300 and 2,000 m/z at a resolution of 60,000 at m/z 400 (automatic gain control [AGC] target of 1E6; maximum ion injection time [IIT] of 500 ms). The five most intense precursors with charge states 2+ were used were selected with an isolation window of 1.6 m/z and fragmented by HCD with normalized collision energies of 25. The precursor mass tolerance was set to 10 ppm, and dynamic exclusion (30 s) was enabled.

5. MaxQuant Search

The MS raw files were processed by MaxQuant (Cox and Mann, 2008) (version 1.6.0.16) and MS/MS spectra were searched against UniProt mouse database (downloaded on October, 2017; 52,026 entries) and fasta file using the recombinant protein was used for the MQ-search via the Andromeda search. Mass tolerance after recalibration of precursor mass and fragment ion mass were set as 6 and 20 ppm, respectively. Allowed variable modifications included protein deamidation (N), oxidation (M). Cysteine carbamidomethylation was defined as a fixed modification. Minimal peptide length was set to 7 amino acids with the maximum of two enzymatic mis-cleavages. The false discovery rate (FDR) was set to 1% for both peptide and protein identifications.

6. Results and discussion

Database search led to the identification of different proteins. The major protein identified in this sample was the mutant recombinant prodomain ADAM17. The coverage was moderate in all samples around 18.9%. However, the prodomain of ADAM17 has a coverage of 78.1%. It is possible to detect the mutation at the position 40 (R40A) (see Figure 1 and see sequence).

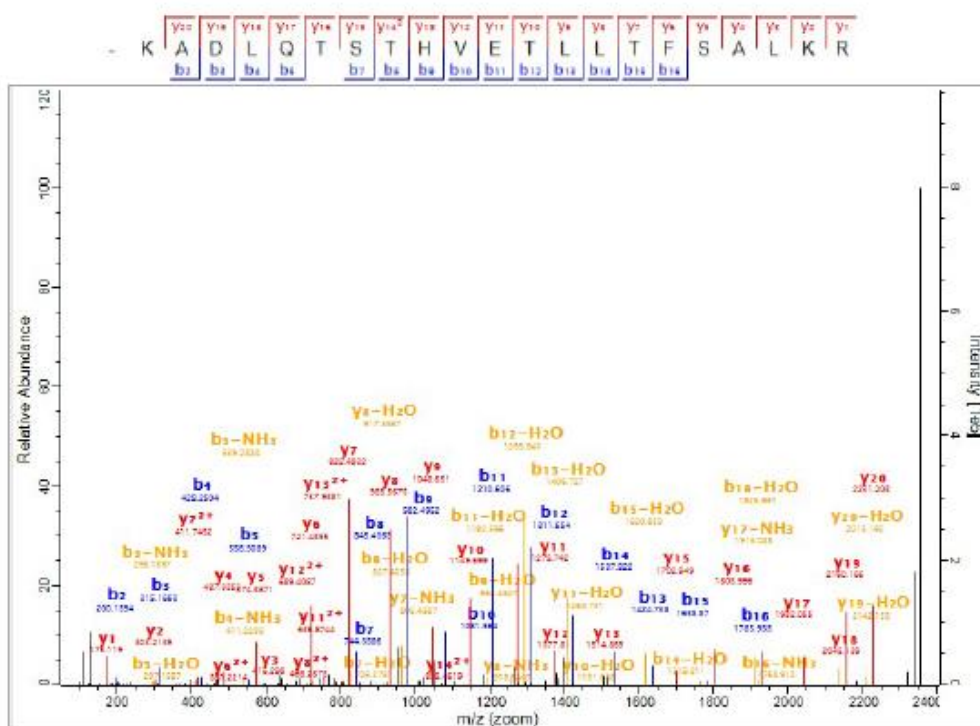


Figure 1. MS/MS spectra showing the mutations R40A. In the MS/MS spectra is possible to observe the peptide KADLQSTHVELLTFSALKR containing the mutation R40A in the second position of the sequence in this peptide.

MGSSHHHHHSSGLEKLDSELLSDYDILSLNIQQHSVRKADLOTSTHVET
LTFSALKRHFkLYLTSSTERFSQNFKVVVDGKNESEYTVKWQDFFTGH
VVGEPDSRVLAHIRDDDVIRINTDGAENIEPLWRFVNDTKDKRMLVYK
SEDIKNVSR LQSPKVCGYL

Sequence 1. Sequence coverage band 1 of recombinant mouse ADAM17 prodomain. The highlighted sequences indicates the peptides found using LC MS analysis: 78.1 % Sequence coverage

Danksagung

Vielen Dank an alle, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben. Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Joachim Grötzinger, für die Bereitstellung des Themas, die erstklassige Betreuung, Zusammenarbeit und die Hilfestellungen bei verschiedensten Problemen. Weiterer Dank gilt Frau PD Inken Lorenzen für ihre einzigartige Unterstützung und Betreuung. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Grö, besonders Anne Bartels, Alina Lycke, Fabia Uhrlaub, Lea Egli und Markus Schrader für die gute Atmosphäre. Besonderer Dank ebenfalls an Prof. Stefan Rose-John, dem Direktor des Biochemischen Instituts der CAU, und alle Mitarbeiter dieses Instituts.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Freundin und meinen Freunden für das Verständnis, den Rückhalt und Zuspruch beim Anfertigen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig von mir erarbeitet und verfasst wurde, sowie unter Einhaltung der Regeln für gute wissenschaftliche Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Es wurde keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel herangezogen. Ferner erkläre ich hiermit, dass diese Arbeit von mir bisher weder bei der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht wurde. Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Kiel, den

Publikation

Hülsebus T, Schrader M, Grötzinger J. Resolving the domain functions of the sheddase ADAM17 (P 38). Novel Concepts in Innate Immunity, Tübingen, Deutschland, Juni 2019.